

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

Alternativní metody snižování biologické kontaminace ve vodách

Bc. Barbora Štěpánková

Diplomová práce

2018

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Barbora Štěpánková**
Osobní číslo: **C16465**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Alternativní metody snižování biologické kontaminace ve vodách**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na snižování biologické kontaminace ve vodách.
2. Proveďte laboratorní testy zaměřené na snižování biologické kontaminace ve vodách, výsledky experimentů vyhodnoťte a kriticky zhodnoťte.
3. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí UPa č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu" v platném znění.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Palarčík, Ph.D.

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Konzultant diplomové práce:

Ing. Marek Smolný

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Ostatní konzultanti:

Ing. Petra Peroutková

Ústav environmentálního a chemického inženýrství

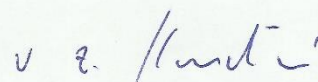
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018

Bc. Barbora Štěpánková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Jiřímu Palarčíkovi, Ph.D. a dále Ing. Petře Peroutkové a Ing. Markovi Smolnému za jejich odborné vedení mé diplomové práce, věnovaný čas a poskytování cenných rad a připomínek, které mi pomohly při zpracování mé diplomové práce.

Zároveň bych chtěla poděkovat celé své rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu mého studia podporovali.

ANOTACE

Tato diplomová práce je zaměřena na metody, pomocí kterých je možné odstranit biologické kontaminace z vody. Testovanými metodami byla fotokatalýza, fotolýza, použití chlornanů a peroxidu vodíku. Testovanými organismy byly *Parachlorella kessleri*, *Saccharomyces cerevisiae* a *Escherichia coli*. Na základě experimentů byly vyhodnoceny účinky jednotlivých metod.

KLÍČOVÁ SLOVA

biologické kontaminace, fotokatalýza, chlorace, fotolýza

TITLE

Alternative methods of reduction biological contamination in the water

ANNOTATION

This diploma thesis is focused on methods, by which is possible to remove biological contaminations from the water. The tested methods were photocatalysis, photolysis, the using of hypochlorites and hydrogen peroxide. The tested organisms were *Parachlorella kessleri*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. On the basis this experiments were determinated the effects of individual methods.

KEYWORDS

biological contaminations, photocatalysis, chlorination, photolysis

OBSAH

ÚVOD.....	14
TEORETICKÁ ČÁST	15
1 VODA.....	15
1.1 Dělení vod dle využití.....	15
1.2 Vyšetření kvality vody.....	16
1.2.1 Vyšetření místní.....	16
1.2.2 Vyšetření laboratorní	16
1.2.3 Mikrobiologický rozbor vody.....	17
1.3 Zdroje znečišťování	18
2 METODY SNIŽOVÁNÍ ZNEČIŠTĚNÍ VE VODÁCH.....	20
2.1 Filtrace	21
2.2 Tlakové membránové procesy	22
2.3 Dezinfekce	25
2.3.1 Chlorace vody	25
2.3.2 Chloraminace vody	26
2.3.3 Ozonizace.....	26
2.3.4 Fotokatalýza.....	26
3 BIOLOGICKÁ KONTAMINACE VE VODÁCH	29
3.1 Indikátorové bakterie	32
3.1.1 Indikátory obecného znečištění	32
3.1.2 Indikátory fekálního znečištění.....	33
3.2 Hygienicky významné organismy ve vodách	35
3.2.1 Gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky	37
3.2.2 Gram-pozitivní koky.....	41
3.2.3 Gram-negativní nefermentující bakterie	43
3.2.4 Potenciálně patogenní atypické (netuberkuloidní) mykobakterie	44
3.2.5 Řasy a sinice	45
4 CÍL PRÁCE	46
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	47
5 MATERIÁL.....	47
5.1 Testované organismy	47

5.2	Přístroje.....	47
5.3	Laboratorní pomůcky.....	48
5.4	Chemikálie a reagenty.....	48
5.5	Kultivační média a roztoky.....	50
6	PRACOVNÍ POSTUPY	54
6.1	Stanovení koncentrace chlorofylu-a	54
6.2	Postup odstraňování řas pomocí fotokatalýzy	55
6.3	Postup odstraňování řas pomocí H ₂ O ₂	56
6.3.1	Postup odstraňování řas pomocí H ₂ O ₂	56
6.3.2	Postup odstraňování řas pomocí fotolýzy s přidavkem H ₂ O ₂	56
6.4	Postup odstraňování řas pomocí SAVO original.....	57
6.4.1	Postup odstraňování řas pomocí SAVO original.....	57
6.4.2	Postup odstraňování řas pomocí fotolýzy s přidavkem SAVO original.....	57
6.4.3	Postup odstraňování řas pomocí fotokatalýzy s přidavkem SAVO original	58
6.5	Postup kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur.....	58
6.5.1	Přímé stanovení počtu buněk.....	58
6.5.2	Nepřímé stanovení počtu buněk plotnovou metodou	59
6.6	Postup odstraňování kvasinek pomocí fotokatalýzy.....	60
6.7	Postup odstraňování kvasinek pomocí H ₂ O ₂	61
6.8	Postup odstraňování kvasinek pomocí SAVO original	61
6.9	Postup odstraňování <i>E. coli</i> pomocí fotokatalýzy	62
6.10	Postup odstraňování <i>E. coli</i> pomocí H ₂ O ₂	62
6.11	Postup odstraňování <i>E. coli</i> pomocí SAVO original	62
7	VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE	63
7.1	Stanovení chlorofylu-a.....	63
7.2	Fotolýza	63
7.3	Odstraňování řas pomocí fotokatalýzy	64
7.4	Odstraňování řas pomocí H ₂ O ₂	66
7.5	Odstraňování řas pomocí SAVO original.....	67
7.6	Odstraňování kvasinek pomocí fotokatalýzy.....	70
7.7	Odstraňování kvasinek pomocí H ₂ O ₂	71
7.8	Odstraňování kvasinek pomocí SAVO original	72
7.9	Odstraňování <i>E. coli</i> pomocí fotokatalýzy	74
7.10	Odstraňování <i>E. coli</i> pomocí H ₂ O ₂	75

7.11 Odstraňování <i>E. coli</i> pomocí SAVO original	76
ZÁVĚR	77
ZDROJE.....	79

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK, ROVNIC A GRAFŮ

Obrázek 1 – Schéma procesu čištění vody	20
Obrázek 2 – Schéma filtru pro rychlou pískovou filtraci	21
Obrázek 3 – Schéma filtru u pomalé pískové filtrace	22
Obrázek 4 – Přehled membránových separací	24
Obrázek 5 – Princip membránových separací	24
Obrázek 6 – Schéma excitace elektronů a vznik elektronových děr	28
Obrázek 7 – Cesty přenosu vodních bakterií	31
Obrázek 8 – <i>Escherichia coli</i> v elektronovém mikroskopu	38
Obrázek 9 – <i>Salmonella enteritidis</i> na DC agaru (patrná produkce H ₂ S)	39
Obrázek 10 – <i>Shigella</i> spp.	40
Obrázek 11 – <i>Staphylococcus aureus</i> v elektronovém mikroskopu při zvětšení 20 000 x	42
Obrázek 12 – <i>Legionella pneumophila</i> v elektronovém mikroskopu	44
Obrázek 13 – Aparatura pro fotokatalytickou degradaci řas	55
Obrázek 14 – Nákres postupu ředění kultury a následné očkování na médium	60
Tabulka 1 – Souhrn faktorů, zdrojů a účinků znečištění vody	19
Tabulka 2 – Hlediska dělení mikroorganismů	29
Tabulka 3 – Patogeny přenášené vodou	30
Tabulka 4 – Skupiny bakterií, nejčastěji izolované při stanovení celkového počtu bakterií	35
Tabulka 5 – Přehled hygienicky významných vodních patogenů	37
Tabulka 6 – Seznam použitých chemikálií	49
Tabulka 7 – Složení Sabouraud Dextrose agar	50
Tabulka 8 – Složení Masopeptonového agaru	50
Tabulka 9 – Složení Masopeptonového bujonu	51
Tabulka 10 – Zásobní roztoky solí pro přípravu živného roztoku pro řasy	52
Tabulka 11 – Hodnoty koncentrace chlorofylu-a v t = 0 min a t = 24 hod.	63
Rovnice 1 – Princip fotokatalýzy	28
Rovnice 2 – Stanovení koncentrace chlorofylu-a	54
Rovnice 3 – Výpočet celkového počtu buněk	59
Rovnice 4 – Hodnocení kvantitativního nárůstu bakterií v CFU/ml	60
Graf 1 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase – fotolýza	64
Graf 2 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, různá koncentrace katalyzátoru	65
Graf 3 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, s různými přídávky H ₂ O ₂	66
Graf 4 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, různý přírůstek H ₂ O ₂ + UV-LED	67
Graf 5 – Závislost koncentrace chlorofylu-a a na čase, různý přírůstek SAVO original	68
Graf 6 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přírůstku 12 µl SAVO original	69
Graf 7 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přírůstku 24 µl SAVO original	69
Graf 8 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přírůstku 48 µl SAVO original	70
Graf 9 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přírůstek katalyzátoru TiO ₂	71

Graf 10 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přídavek H ₂ O ₂	71
Graf 11 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přídavek 24 µl SAVO original.....	72
Graf 12 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přímé stanovení + SAVO original	73
Graf 13 – Závislost počtu <i>E. coli</i> v 1 ml na čase – přídavek katalyzátoru TiO ₂	74
Graf 14 – Závislost počtu <i>E. coli</i> na čase – přídavek H ₂ O ₂	75
Graf 15 – Závislost počtu <i>E. coli</i> na čase – přídavek SAVO original	76

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A.	<i>Aeromonas</i>
C.	<i>Candida</i>
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CB	Vodivostní pás
CFU	Colony forming unit (Kolonie tvořící jednotku)
Cl.	<i>Clostridium</i>
ČOV	Čistírna odpadních vod
ČSN	Česká technická norma
DC	Deoxycholát, citrát
DFA	Direct fluorescent antibody (Fluorescenční barvení protilátek)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleová kyselina)
E.	<i>Enterococcus</i>
EA	Endův agar
EAEC	Enteroagregativní <i>E. coli</i>
E _{bg}	Energie zakázaného pásu fotokatalyzátoru
E _{cb}	Energie v prázdném vodivostním pásu fotokatalyzátoru
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemoragické <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropatogenní <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>E. coli</i>
E _{vb}	Energie naplněného valenčního pásu fotokatalyzátoru
HPC	Heterotrophic plate count (Indikátory organického znečištění)
HUS	Hemolyticko-uremický syndrom
KA	Krevní agar
L.	<i>Legionella</i>

<i>Lept.</i>	<i>Leptospira</i>
<i>M.</i>	<i>Mycobacterium</i>
MPA	Masopeptonový agar
MF	Mikrofiltrace
NF	Nanofiltrace
ONPG	o-nitrophenyl- β -D-galactoside
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerázová řetězová reakce)
RO	Reverzní osmóza
<i>S.</i>	<i>Salmonella</i>
SA	Sabouraud agar
<i>Sh.</i>	<i>Shigella</i>
Spp.	Species
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
STEC	Shiga-like toxigenní <i>E. coli</i>
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
TL	Termolabilní
TS	Termostabilní
UF	Ultrafiltrace
UPEC	Uropatogenní <i>E. coli</i>
UV	Ultrafialové
<i>V.</i>	<i>Vibrio</i>
VB	Valenční pás
VTEC	Verotoxigenní <i>E. coli</i>
XLD	Xylulóza, lyzin, deoxycholát
ZR	Zásobní roztok

ÚVOD

V současné době je velkým problémem znečištění vody, které má za následek šíření nebezpečných onemocnění. Voda bývá znečištěna fyzikálními, chemickými a biologickými nečistotami. Hlavními biologickými činiteli jsou řasy, améby, viry, sinice a řada mikroorganismů, jako jsou bakterie, mikroparazit, kvasinky nebo plísně. Z mikrobiologického hlediska jsou nejvíce znečištěné odpadní vody ze zemědělství a komunální vody. Řasy, améby a sinice jsou nebezpečné hlavně ve vodních nádržích. Je tedy velmi důležité, aby se během úprav vod odstranilo co nejvíce kontaminací. Vodu je možno upravovat různými chemickými, fyzikálními či biologickými postupy. Při mikrobiologickém rozboru vody jsou dle vyhlášky č. 252/2004 Sb. sledovány indikátorové bakterie (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium perfringens*), enteroky nebo jiné koliformní bakterie (rod *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*). Jakost vod ve vodních nádržích se provádí od dubna do října a zahrnuje měření chlorofylu-a, průhlednosti či teploty vody. Stanovení chlorofylu-a je prováděno dle platné normy ČSN EN ISO 10260.

V teoretické části diplomové práce jsou shrnuty poznatky o vodě, jako je její dělení a vyšetřování. Dále jsou zde uvedeny metody odstraňování různých kontaminací z vody. Poslední část je věnována biologické kontaminaci vody. Experimentální část této diplomové práce je zaměřena na odstraňování řas (*Parachlorella kessleri*), kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) a bakterií (*Escherichia coli*) za použití fotolýzy, fotokatalýzy, přísadků peroxidu vodíku a SAVO original.

TEORETICKÁ ČÁST

1 VODA

Podle zákona 254/2001 Sb., Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon) se voda rozděluje na dva základní typy – voda povrchová a voda podzemní (Sbírka zákonů, 2001).

Povrchová voda pochází hlavně ze srážek a vyskytuje se na zemském povrchu. Pro tyto vody je charakteristický život různých organismů, které ji určitými způsoby ovlivňují. Dle odtokového procesu ji lze rozdělit na plošný srážkový odtok, vodní toky a vody stojaté. Povrchová voda vzniká převážně z atmosférické vody a je možno ji rozdělit na vodu stojatou a tekoucí (Malý a Malá, 2006; Pitter, 2015; Tlapák *et al.*, 1992).

Půdní voda se vyskytuje v půdě, ale nevytváří souvislou hladinu. Tato voda je pro lidi nevyužitelná, protože se nedá jímat ani čerpat, ale je velmi důležitá pro závlahu zemědělských plodin. Lze ji rozdělit na vodu adsorpční, kapilární a gravitační.

Podzemní voda se přirozeně vyskytuje v zemských puklinách, dutinách a dalších pórech hornin bez ohledu, zda tvoří nebo netvoří souvislou hladinu. Mezi podzemní vody řadíme i vody ve studních a vrtech. Podzemní voda z pramenů nebo studní je z mikrobiologického hlediska většinou nezávadná, protože pronikáním vody půdou se voda zbavuje nečistot a obohatí se o minerály obsažené v půdě. Ukazatelem chemického složení podzemní vody jsou klimatické, geografické, biochemické a fyzikálně-chemické faktory. Počet mikroorganismů se s hloubkou vody snižuje z důvodu klesání obsahu kyslíku a živin, které mikroby potřebují pro život (Michek a Daříčková, 2007; Zelinka, 2003; Pitter, 2015; Hanousek, 2005).

1.1 Dělení vod dle využití

Základní dělení vody dle jejího využití je na vody pitné, užitkové a provozní. Tyto vody se liší nejen svou kvalitou, ale také způsobem jejich získávání.

Pitná voda musí splňovat veškeré zdravotní a technické nároky. Nikdy nesmí obsahovat škodliviny, jako jsou látky toxické, radioaktivní nebo biologicky aktivní látky a organismy, které by měly neblahý vliv na lidské zdraví. Pitná voda by měla obsahovat dostatek biogenních prvků. Zařízení pro pitnou vodu musí být zabezpečena před znečištěním. Kvalitní pitná voda by měla být chutná, neměla by zapáchat a měla by dobře vypadat (Pitter, 2015).

Užitková voda je hygienicky nezávadná, ve které se nevyskytují bakterie a ani neobsahuje zdraví škodlivé látky. Užitková voda však není určena k přímému požití. Využívá se omezeně, například k praní prádla nebo ke koupání, nesmí však být využita k ošetřování osob se sníženou imunitou. Z užitkové vody nesmí být připravená strava ani se nesmí používat k omývání nádobí (Švec a Plesník, 1986).

Provozní vody se využívají k výrobním a nevýrobním procesům. Dle účelu je lze rozdělit na vody chladicí, napájecí, betonářské, plavící a proplachové. Rozvody pro provozní, užitkovou a pitnou vodu musí být vzájemně odděleny a musí být barevně odlišeny (Švec a Plesník, 1986; Lukášová, 2001).

1.2 Vyšetření kvality vody

Voda se řadí mezi nejvíce kontrolované produkty, které jsou určené k přímé spotřebě (Malý a Malá, 2006). Výskyt bakterií v pitné vodě, způsobený kontaminací lidskými nebo zvířecími exkrementy, je nejčastějším a nejrozšířenějším zdravotním rizikem na světě. Konzumace vody kontaminované bakteriemi způsobuje různá závažná lidská onemocnění. Jediným a především dostupným řešením, které vede ke zjištění míry a charakteru kontaminace, je laboratorní rozbor vzorku vody. Výstupem z analýzy je hodnocení vody z hlediska fyzikálního, chemického a mikrobiologického (Zhou *et al.*, 2011).

1.2.1 Vyšetření místní

Místní vyšetření slouží ke zjištění faktorů, zapříčiňujících kontaminaci vodního zdroje. Všeobecně se u vodních zdrojů posuzuje místo a vzdálenost od kanalizací a hnojišť. Dále se u tekoucích vod věnuje pozornost továrnám umístěným proti proudu vody. Vyšetření místní předchází vyšetření laboratornímu, přičemž díky přesným údajům vycházejících z vyšetření místního a následně laboratorního se snáze stanoví zdroj znečištění (Fresenius *et al.*, 1988).

1.2.2 Vyšetření laboratorní

K laboratornímu vyšetření se odebírají 2 vzorky vody do litrové sterilní láhve dle předepsaných pravidel. Vzorek se musí dopravit do laboratoře do 12 hodin od odběru. Jeden vzorek je nutný pro fyzikální a chemické vyšetření. Druhý pro vyšetření mikrobiologické (Frais *et al.*, 1983; ČSN EN ISO 5667 – část 3, 5, 14).

Fyzikální vyšetření vody se provádí před chemickou a mikrobiologickou analýzou. Při tomto vyšetření se hodnotí zákal, barva, vůně, zápach, chuť a teplota. Zákal mohou způsobit organické látky, ale také mikroorganismy či řasy. Chuť se hodnotí pouze u mikrobiologicky nezávadné důkladně dezinfikované vody. Barva a intenzita zabarvení se hodnotí až po usazení nečistot. Zápach může být způsoben přítomností anorganických a organických látek nebo mikroorganismů (Frais *et al.*, 1983).

Chemické vyšetření vody informuje nejen o přítomnosti látek, které by při vyšších koncentracích ovlivňovaly kvalitu vody, ale i o přítomnosti látek – indikátorů závadnosti vody, např. dusitany jsou indikátorem čerstvého fekálního znečištění. Při tomto vyšetření se hodnotí pH a následně přítomnost amoniaku, dusitanů, chloridů, železa a dusičnanů. Ze zdravotnického hlediska se musí sledovat množství chloridových a amonných iontů. Jejich zvýšený obsah indikuje fekální znečištění vody, které je způsobeno močí a stolicí zvířat a lidí (Häusler, 1994; Švec a Plesník, 1986).

1.2.3 Mikrobiologický rozbor vody

Mikrobiologický rozbor je založen na sledování mikroorganismů, které poukazují na fekální a obecné znečištění. Sledují se tedy indikátory znečištění vody patogenními bakteriemi.

Hlavním ukazatelem je zvýšený nález mezofilních, psychrofilních a koliformních bakterií, které jsou nepatogenní, popřípadě podmíněně patogenní, jelikož se přirozeně vyskytují v zažívacím traktu zvířat a lidí. Hodnotí se titr Coli, vyjadřující nejmenší množství vody, ve kterém se vyskytne alespoň jeden mikrob, a index Coli, který určuje počet koliformních mikroorganismů v 1 litru vody. Výhradně při vážném podezření na přítomnost patogenních mikroorganismů se provádí cílené vyšetření vody, jelikož je vyšetření velmi rozsáhlé, pracné a finančně náročné. Vody se dle čistoty dělí do 4 skupin, které jsou dané českou technickou normou 75 7221 (ČSN), a to na podzemní vodu, minerální vodu, termální vodu a vodu vřídelní (Říhová Ambrožová, 2007; Jonáš, 1990).

Při mikrobiologickém rozboru pitné vody je nutné stanovení několika ukazatelů: sleduje se přítomnost bakterií – *Escherichia coli* (*E. coli*), enterokoky, *Clostridium* (*Cl.*) *perfringens*, *Pseudomonas* (*P.*) *aeruginosa*, koliformních bakterií a počet kolonií (CFU) při teplotách 22 °C a 36 °C. Sleduje se i výskyt virů. Vzhledem ke zdravotním hlediskům je monitorování výskytu patogenních bakterií velice důležité. Mikroorganismy mohou

vyvolávat řadu vážných alimentárních nebo kožních onemocnění (Votava, 2003; Mlejnková a Chaloupek, 2014).

Bakteriologický rozbor vody se ve většině případů provádí kultivačně, ale lze využít i mikroskopii. Kultivace se dělí na metody statické a kontinuální.

Kontinuální (průtoková) kultivace je kultivace, při které jsou k rostoucí kultuře neustále přiváděny čerstvé živiny a odváděny přebytky.

Statická kultivace probíhá na povrchu pevného nebo tekutého média, které je zpočátku bohaté na živiny, ale během růstu bakterií jsou živiny vyčerpány (Buňková a Doležalová, 2010).

1.3 Zdroje znečištění

V přírodě se nevyskytuje naprosto čistá voda. Voda pokaždé obsahuje nejen chemické látky (roztoky solí a plynů), ale i živé organismy. Vysoký obsah škodlivin je mnohem častější a je způsoben převážně lidskou činností. Zdroje znečištění lze rozdělit do čtyř skupin – bodové, plošné, difúzní a tepelné zdroje znečištění.

Bodové zdroje znečištění jsou nejčastěji průmyslové a odpadní vody. Jedná se o určité zdroje, ze kterých jsou škodlivé látky potrubím, kanály nebo příkopy přiváděny do povrchových vod. Tyto zdroje jsou lehce naleznitelné a je možno je monitorovat a regulovat. Mezi tyto zdroje řadíme továrny, čistírny odpadních vod (ČOV), tankery, skládky a potrubí.

Plošné zdroje znečištění jsou průsakové a splachové vody. Plošným zdrojem se rozumí rozsáhlé území, kdy jsou škodlivé látky splavovány z tohoto území povrchovými vodami. Zdroje je nelehké a velmi nákladné najít a kontrolovat. Patří sem především zemědělsky obdělávaná pole a pastviny, parkoviště či golfové hřiště.

Difúzní zdroje znečištění jsou rozšířené bodové zdroje.

Tepelné zdroje znečištění jsou takové zdroje, které přebytečným přívodem tepla do vody zrychlují biochemické procesy, snižují rozpustnost kyslíku ve vodě a mají neblahý vliv na ryby (Pitter, 2015; Cenia, 2015).

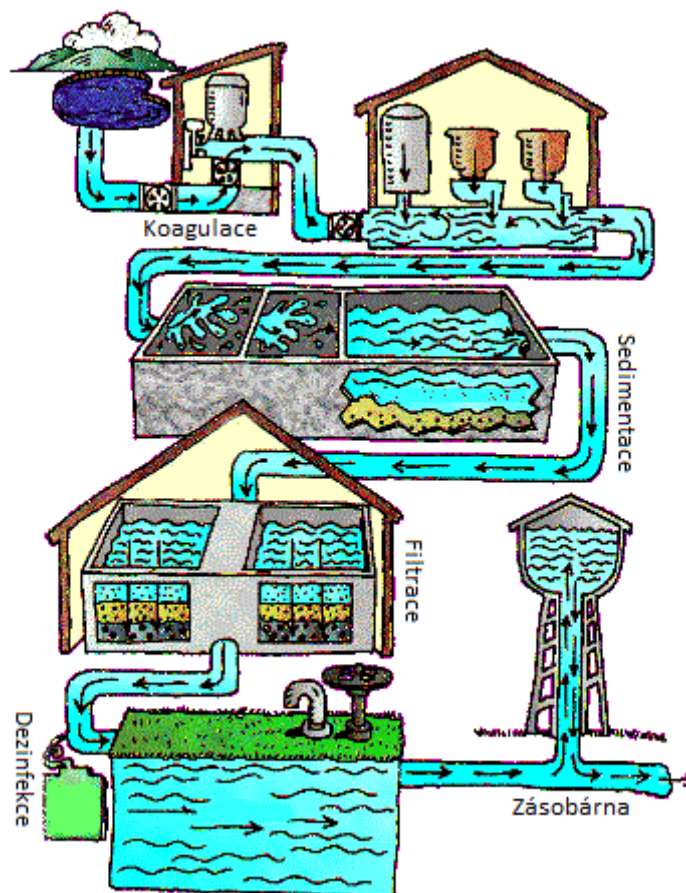
Souhrn faktorů, zdrojů a účinků znečištění vody je uveden v tabulce 1 (Cenia, 2015).

Tabulka 1 – Souhrn faktorů, zdrojů a účinků znečištění vody (převzato a upraveno: Cenia, 2015)

Znečišťující faktory	Zdroje znečištění	Účinky znečištění
Bakterie, viry, parazité	Výkaly lidí a zvířat	Infekční onemocnění
Organické odpady	Zemědělství, splašky	Uhynutí ryb
Anorganické chemické látky	Čisticí prostředky, odpadní vody z továren	Rakovina kůže, poškození nervů, voda není pitná
Organické chemikálie	Čisticí prostředky, odpadní vody z továren	Rakovina kůže, poškození nervů, uhynutí ryb
Hnojiva	Hnůj, splašky	Rychlejší růst řas, kdy jejich zbytky potřebují kyslík → uhynutí ryb
Usazeniny	Eroze	Zakalení vody → zpomalení fotosyntézy, přenos škodlivin
Radioaktivní látky	Těžba a výroba uranu, jaderné elektrárny, výrobní jaderných zbraní	Rakovina, genetické mutace, vrozené vady
Nadměrné teplo	Chlazení v továrnách a elektrárnách	Poškození vodních organismů

2 METODY SNIŽOVÁNÍ ZNEČIŠTĚNÍ VE VODÁCH

Voda může být upravována a čištěna různými fyzikálními, chemickými nebo biologickými metodami. Výběr vhodné metody či jejich kombinace je závislý na mnoha faktorech, např. o jaký druh znečištění se jedná nebo k čemu má voda následně sloužit. Mezi fyzikální metody patří filtrace, sedimentace a membránové procesy. Do metod chemických řadíme oxidační procesy (chlorace, ozonizace, fotokatalýza), srážení, koagulaci a flokulaci. Biologickými metoda jsou převážně čištění odpadních vod pomocí tzv. aktivovaného kalu. Klasický proces úpravy vody je následovný – koagulace, flokulace, sedimentace, písková filtrace a dezinfekce např. chlorace a ozonizace (obrázek 1). V omezeném měřítku jsou využitelné také další postupy, jako je např. sterilizace za zvýšené teploty. Dezinfekce chemickými nebo fyzikálními metodami je potřebná k inaktivaci nebo k odstranění infekčních mikroorganismů (Clever *et al.*, 2000; Matilainen *et al.*, 2006; CDC, 2015; LeChevallier a Au, 2004; Betancourt *et al.*, 2004; Madaeni, 1999).

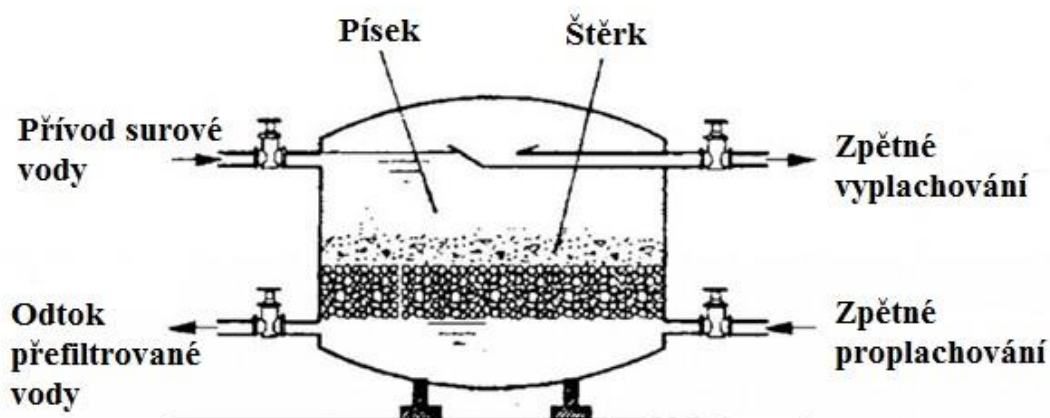


Obrázek 1 – Schéma procesu čištění vody (převzato a upraveno: CDC, 2015)

2.1 Filtrace

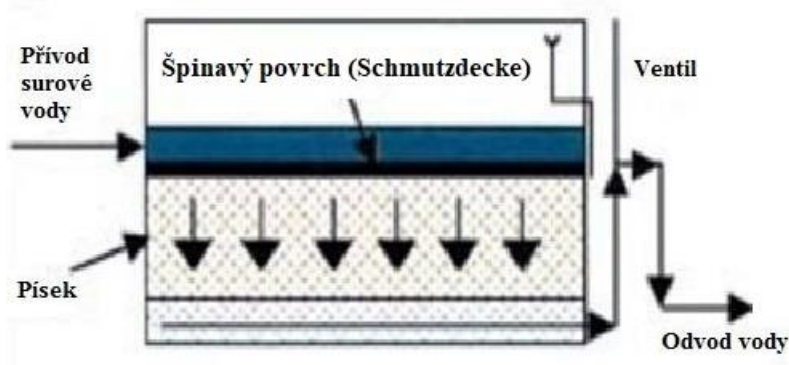
Jedná se o proces, kterým se odstraňují převážně pevné částice, kdy voda protéká přes porézní materiál (filtrační papír, vrstva písku, aj.), na kterém se částice zachytí. Tímto procesem se odstraní část nerozpuštěných látek a patogenních mikrobů. Nejčastěji využívanými typy filtrace jsou tzv. rychlá a pomalá písková filtrace nebo filtrace přes aktivní uhlí (Betancourt *et al.*, 2004, Crittenden *et al.*, 2012a; TUDelft, 2016; CDC, 2015; LeChevallier a Au, 2004).

Rychlá písková filtrace je nejefektivnější při odstraňování kalu, manganu a železa. Méně účinná je při likvidaci bakterií a látek, které jsou zodpovědné za zápach a barvu vody. Tato metoda je velmi málo účinná při odstraňování virů, fluoridů a solí. Filtrační proces probíhá nejčastěji v betonové nádrži naplněné pískem a štěrkem. Nádrž může být otevřená (gravitační filtrace) nebo uzavřená (tlaková filtrace). Na odstraňování nečistot se podílí mechanický princip, při kterém se velké částice zachytí ve filtru mezi zrníčky písku, a dále pak fyzikální adsorpce, kdy malé částice přilnou na povrch zrn písku, díky Van der Waalsovým silám. Rychlost filtrace je 4 – 21 m³/h. Výhodou metody je opakované používání filtru, vysoká účinnost při odstraňování kalu a cyanobakterií. Nevýhodou jsou vysoké provozní náklady a neúčinnost při odstraňování mikrobů. Na obrázku 2 je schéma rychlé pískové filtrace (Brikké a Bredero, 2003; Crittenden *et al.*, 2012b).



Obrázek 2 – Schéma filtru pro rychlou pískovou filtrace (převzato a upraveno z WHO, 1996)

Pomalá písková filtrace se od rychlé pískové filtrace liší v době zadržení vody ve filtru. Touto dobou se rozumí doba, po kterou je voda na základě filtrační rychlosti ve filtru teoreticky zachována. Rychlost filtrace u pomalé pískové filtrace je v rozmezí 0,1 – 0,4 m³/h. Úprava vody pomalou pískovou filtrací kombinuje biologické, chemické a fyzikální procesy. Voda pomalu prochází směrem dolů přes vrstvu písku. Jemné částice jsou filtrovány do písku a v horní části filtrační vrstvy zůstávají mikroorganismy, které se živí bakteriemi a organickými látkami. Tento proces je vysoce účinný při odstraňování bakterií, virů, ale i prvoků. Dále ji lze využít při odstraňování kalu a těžkých kovů, jako je například olovo, měď a zinek. Pomalou pískovou filtrací se neodstraní soli, fluoridy a trihalomethany. Podstatou metody je schopnost organismů odstranit jiné organismy a patogeny. Nejdůležitější částí je vrchní vrstva písku, tzv. špinavý povrch (schmutzdecke), ve kterém se vytváří mikrobiální společenstvo. Mikroby pocházející ze zdroje vody se po několika dnech usazují v písku a živí se bakteriemi, které filtrem prostupují. Na obrázku 3 je znázorněno složení filtru, kdy navrchu je jemný písek a ve spodní části je šterk. Rychlost filtrace je v rozmezí 0,1 - 0,3 m³/h na m² povrchu (Brikké a Bredero, 2003).

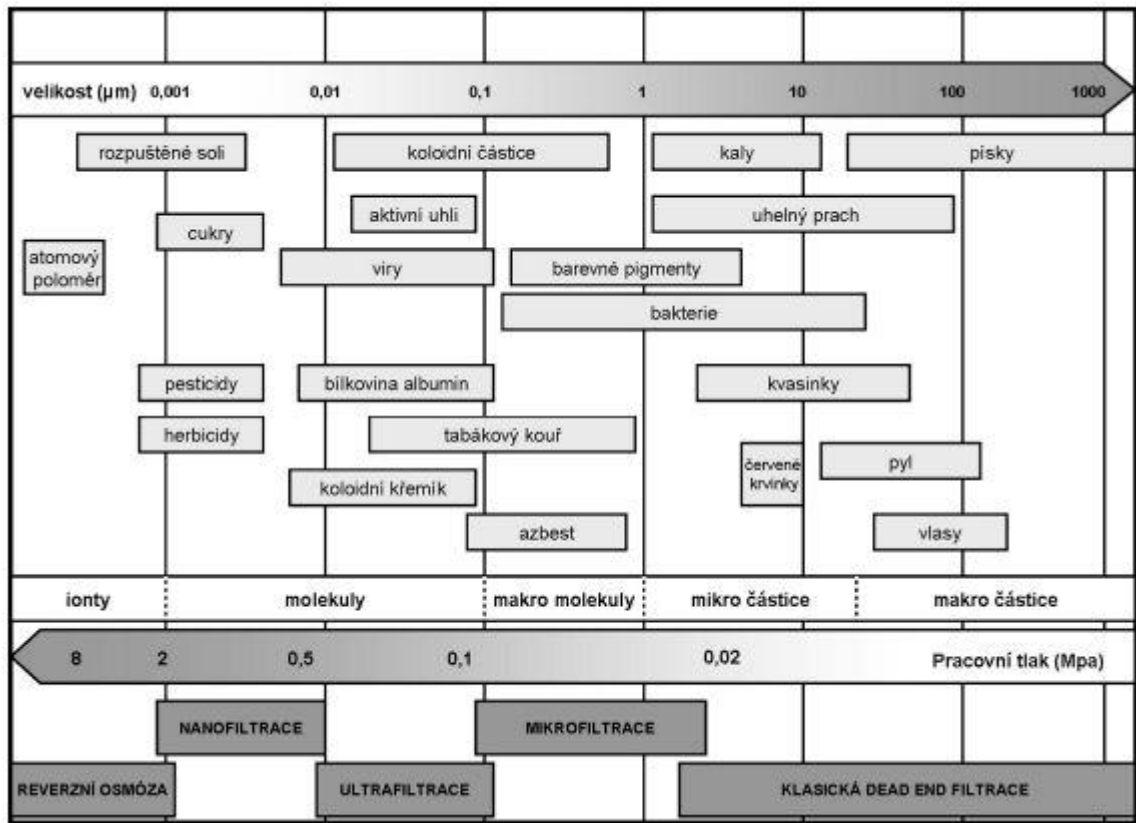


Obrázek 3 – Schéma filtru u pomalé pískové filtrace (převzato a upraveno: LeCraw, 2000)

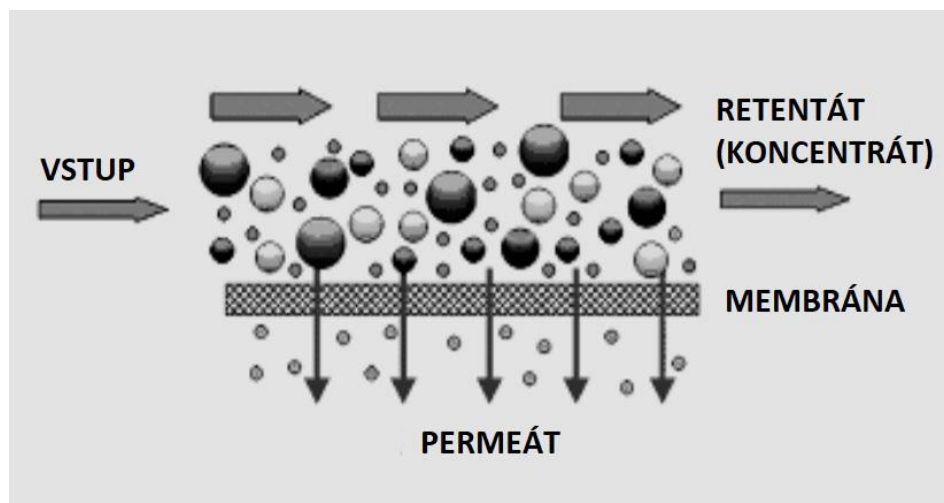
2.2 Tlakové membránové procesy

Membránová separace je proces, při kterém roztoky prochází přes polopropustné membrány. Nedochází k usmrcení mikrobů, ale k jejich zachycení na membránách. Podle velikosti pórů membrány a použitého tlakového rozdílu, lze tuto metodu rozdělit na mikrofiltraci (MF), ultrafiltraci (UF), nanofiltraci (NF) a reverzní osmózu (RO) (obrázek 4). Membrány jsou většinou vyrobeny ze syntetických organických polymerů (acetát celulózy, polysulfony, polypropylen, polyvinyliden fluorid), popřípadě

z keramiky a kovů. Nevýhodou keramických filtrů je mechanická křehkost a vysoká cena. Kovové filtry jsou nejčastěji z nerezovací oceli, která se využívá při vysokých teplotách. Nevýhodou používání membrán je jejich zanášení a s tím související nutnost regenerace. Membrány zajišťují selektivní oddělení tekutiny od dalších znečišťujících látek (Baker, 2004). Principem této metody je, že vstupující nástřík se na semipermeabilní membráně, která vytvoří selektivní bariéru, dělí na permeát, tedy proud, který projde membránou, a retentát, což je obohacený proud o složky neprocházející membránou (obrázek 5). Membrány se používají nejen v oblastech týkajících se ochrany životního prostředí, ale hlavně v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, v biotechnologiích a v lékařství. MF je využitelná pro separace větších částic (bakterie, kvasinky) zatímco UF je využitelná pro separace makromolekul (bílkoviny, polysacharidy) a pomocí RO se odstraňují iontové látky. Výběr membrány a vhodného procesu pro konkrétní aplikace je velmi složitý a náročný. Nejdůležitějším parametrem výběru membrány je velikost pórů. Při odstraňování mikroorganismů je důležité, aby průměr pórů byl menší, než je velikost mikrobů, když ani to nezaručuje 100% likvidaci, protože bakterie jsou snadno deformovatelné a mění se během fáze růstu. Např. *E. coli* se odstraňuje pomocí membrány vyrobené z porézního acetátu celulózy. Je prokázáno, že membrány kladně nabitě v neutrálním pH, lze použít k odstranění záporně nabitých virů ve vodě i přesto, že byla využita membrána s velkými póry. Výhodou je technická odolnost a vysoká účinnost při odstraňování nerozpuštěných a rozpuštěných látek. Pomocí membránových separací lze odstranit velké množství mikroorganismů (Madaeni, 1999; Choi *et al.*, 2005; Honzajková *et al.*, 2010; Jelínek *et al.*, 2008).



Obrázek 4 – Přehled membránových separací (převzato: Honzajková *et al.*, 2010)



Obrázek 5 – Princip membránových separací (převzato: Honzajková *et al.*, 2010)

2.3 Dezinfekce

Dezinfekcí nazýváme soubory opatření, která vedou ke zničení nebo k usmrcení patogenních nebo potenciálně patogenních mikroorganismů v prostředí, na neporušené kůži a na různých površích, pomocí velmi reaktivních látek. Dezinfekční postupy, jejichž cílem je zabránit přenosu onemocnění, jsou fyzikální (např. použití ultrafialového záření (UV) poškozujícího nukleové kyseliny mikrobů, pasterizace), chemické (např. chlorace, chloraminace) a kombinované (teplota nad 60 °C s použitím chemických látek) (Betancourt *et al.*, 2004, Melicherčíková, 2015; Van Leeuwen, 2000). Dezinfekci lze dále rozdělit na ochrannou (profylaktickou), která je součástí úplných hygienických opatření, a ohniskovou (represivní), zaměřující se na zlikvidování patogenních bakterií a ukončení šíření onemocnění (Melicherčíková, 2015). Chemická sterilizace je proces, při kterém dochází k usmrcení převážné části mikrobů (Melicherčíková, 2015). Chemické dezinfekce patří mezi látky, které zpomalují, popřípadě zastavují růst nežádoucích mikroorganismů (Števkovičová, 2007).

2.3.1 Chlorace vody

Chlorace je chemický způsob dezinfekce vody, který je nečastější a nejrozšířenější. Chlór, pro svůj vysoký oxidační potenciál, deaktivuje patogeny ve vodě a poskytuje ochranu proti opětovné kontaminaci. Chloraci je možné zařadit kdykoliv během úpravy vody, ale obvykle je chlór z ekonomických důvodů přidáván až v poslední fázi procesu, a to z důvodu odstranění zbytkových látek a mikroorganismů, které nebyly odstraněny v předešlých krocích (Brikké a Bredero, 2003). Při dezinfekci chlorem mohou vznikat vedlejší produkty (trihalomethany, halogenoctové kyseliny), které jsou mutagenní a karcinogenní. Vznikají reakcí chloru (popř. silnými oxidačními činidly – chlornany) s organickými látkami přirozeně se vyskytujícími ve vodách. Chloraci lze rozdělit na primární, kdy se chlór přidává během čistícího procesu, a sekundární, při které se chlór do vody přidává až v distribučním systému, jejíž výhodou je ničení biofilmu, což má za následek eliminaci problémů související s chutí a zápachem vody. Chlór se do vody může přidávat ve třech formách – plynný chlór (Cl_2), který je toxický, roztok chlornanu sodného (NaClO) nebo chlornan vápenatý ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$). Elementární chlór ve vodě ničí mikroorganismy, z důvodu působení na jejich buněčnou stěnu. Po průchodu chlóru do buňky skrze buněčnou stěnu dochází jeho působením k poškození buněčného dýchání a aktivity DNA, což jsou procesy důležité pro život, proto dochází ke smrti buněk.

Výhodou chlorace je vysoká účinnost vůči bakteriím, houbám a řasám a malé náklady na provoz (Brikké a Bredero, 2003; Chong *et al.*, 2010; Virto *et al.*, 2005; Merel *et al.*, 2010; Westrick *et al.*, 2010).

2.3.2 Chloraminace vody

V současnosti je čím dál více využívaná dezinfekce pomocí chloraminů, které jsou stabilnější než sloučeniny chlóru a také se při jejich použití tvoří méně vedlejších produktů (Seidel *et al.*, 2005). Na druhou stranu je chlór silnější dezinfekční činidlo, které rychleji inaktivuje bakterie v biofilmu (Wang *et al.*, 2013).

2.3.3 Ozonizace

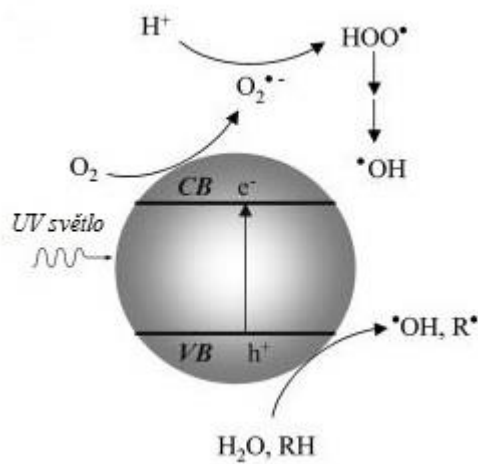
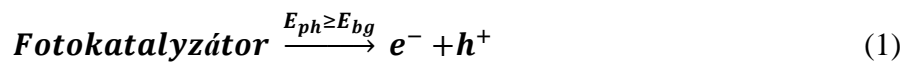
Ozon je nestabilní bezbarvý plyn s charakteristickým zápachem, který obsahuje tři atomy kyslíku. V porovnání s chlorací je ozon účinnějším dezinfekčním činidlem proti bakteriím a virům. Dále snižuje koncentrace železa a manganu ve vodě, za vzniku nerozpustných oxidů kovů, kdy se tyto nerozpustné částice odstraní filtrací.

Ozonizace je chemický proces čištění vody, který je založený na principu dodání ozonu do vody. Využívá se k odstranění pachu a chuti ve vodě, kterou způsobují přírodní organické látky. Je to účinná dezinfekce, která inaktivuje přítomné mikroby ve vodě. Ozon má krátký poločas rozpadu, proto se neskládá, ale vyrábí se na místě pomocí elektrického výboje. Ozon, jako silné oxidační činidlo, se rozpadá na atomární kyslík, který velmi rychle reaguje s aminokyselinami, proteinovými funkčními skupinami a proteiny. Má neblahý vliv na mikroby, protože působí na jejich buněčnou stěnu tak, že ji přímo napadá a tím ji ničí. Bakteriální buňka ztratí cytoplazmu a již nemá schopnost se reaktivovat. Na velké množství organických sloučenin působí oxidačně a mění je na snáze biodegradovatelné sloučeniny. Železnaté, manganaté nebo arsenité ionty kovů ozon oxiduje na nerozpustné formy lehké odstranitelné sedimentací nebo filtrací. Ozonizace je účinnější u gram-negativních bakterií než u gram-pozitivních (Matilainen *et al.*, 2006; LeChevallier a Au, 2004; von Gunten, 2003; Owen *et al.*, 1995, Crittenden *et al.*, 2012d).

2.3.4 Fotokatalýza

Fotokatalýza je moderní oxidační metoda, jejímž principem je vznik hydroxylových radikálů OH•. Je to metoda využívající UV záření, které slouží k dezinfekci vody a má antibakteriální, antivirové a také antifungální vlastnosti. Záření v rozmezí vlnové délky

240 – 280 nm je schopné inaktivovat mikroby, protože dokáže velmi účinně poškozovat jejich DNA a odstraňuje některé nečistoty ve vodě, jelikož určité kontaminanty jsou schopny UV záření absorbovat. Tento proces se nazývá přímá fotooxidace. V některých případech je nutné použít fotokatalyzátor, tedy látku urychlující průběh reakce, jedná se tedy o nepřímou fotooxidaci. Katalyzátor je aktivován světlem o určité vlnové délce, to následně vede k fotoexcitaci a produkci superoxidu a volných radikálů, které působí na kontaminanty ve vodě, a tím je degradují. Nejvhodnějšími fotokatalyzátory jsou polovodiče. V současné době je nejvíce využívaným katalyzátorem oxid titaničitý (TiO_2), ale lze použít i peroxodisulfátový anion ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$), oxid zinečnatý (ZnO), oxid wolframový (WO_3) (Merel *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015). TiO_2 je v různých formách zejména jako prášek, granule nebo jako stabilizovaný nátěr. Aktivuje se zářením o vlnové délce menší než 390 nm a je využíván jako čistý TiO_2 nebo dopovaný dalšími prvky – uhlík, fluor, dusík a další. Přídavkem dochází ke změně optických vlastností a tím ke zvýšení účinnosti (Zhao *et al.*, 2014). Proto, aby mohla fotokatalytická reakce proběhnout, musí být přítomny 3 složky – silné oxidační činidlo (nejčastěji kyslík), emitovaný foton o příslušné vlnové délce a katalyzátor (polovodič). Mechanismem reakce (rovnice 1) je vyvolání excitace na povrchu fotokatalyzátoru, která je vyvolána fotonem, jež musí mít stejnou nebo vyšší energii než je energie zakázaného pásu (E_{bg}) fotokatalyzátoru. Energie E_{bg} je dána jako rozdíl mezi energií naplněného valenčního pásu (E_{vb}) a energií v prázdném vodivostním pásu (E_{cb}) fotokatalyzátoru. Na obrázku 6 je znázorněn princip fotokatalýzy – pomocí záření o určité vlnové délce dojde k excitaci valenčního elektronu z naplněného valenčního pásu (VB), který prochází skrz zakázaný pás polovodiče do prázdného vodivostního pásu (CB). Molekulární excitace má za následek vznik pohyblivých elektronů v energeticky vyšším vodivostním pásu a vznik kladně nabitých elektronových děr v energeticky nižším valenčním pásu katalyzátoru. Excitovaný elektron a elektronová díra se mohou účastnit chemických reakcí. Dále je z obrázku 6 patrný vznik hydroxylového radikálu, podporující oxidaci, a také využití elektronu v redukčních procesech. Fotokatalýza se využívá ve zdravotnictví, v potravinářství i v průmyslu. V současnosti se používá např. k odstraňování barviv, alkoholů a mikroorganismů z odpadních vod (da Silva *et al.*, 2015; Jo a Tyade, 2016; de Lasa *et al.*, 2015; Ola *et al.*, 2015; Gombac *et al.*, 2007; Gombac *et al.*, 2007; Kitano *et al.*, 2007).



Obrázek 6 – Schéma excitace elektronů a vznik elektronových děr (převzato a upraveno: Gombac *et al.*, 2007)

3 BIOLOGICKÁ KONTAMINACE VE VODÁCH

Ve vodě se vyskytuje řada mikroorganismů. Bakteriální zastoupení je nejpočetnější a nejnámennější, protože voda poskytuje příznivé podmínky pro mikrobiální růst. Rozdělení vodních mikrobů je velmi komplikované i díky tomu, že spektrum taxonomického dělení je široké. V tabulce 2 je uvedeno dělení, které se využívá v mikrobiologii. K izolaci bakterií z vod se používají kultivační metody, které však neumožňují detekovat veškeré přítomné mikroby, protože některé bakterie, které lze vykultivovat při stresových podmínkách, snižují svou metabolickou aktivitu (Straškrabová, 1996; Oliver, 2005).

Bakterie, které mohou být přenášeny prostřednictvím kontaminované vody, jsou uvedeny v tabulce 3 (WHO, 2004). Na obrázku 7 jsou uvedeny cesty přenosu vodních bakteriálních patogenů. Každý patogenní mikroorganismus vyvolává onemocnění jinou cestou a využívá jiné brány pro vstup do hostitele (WHO, 2004).

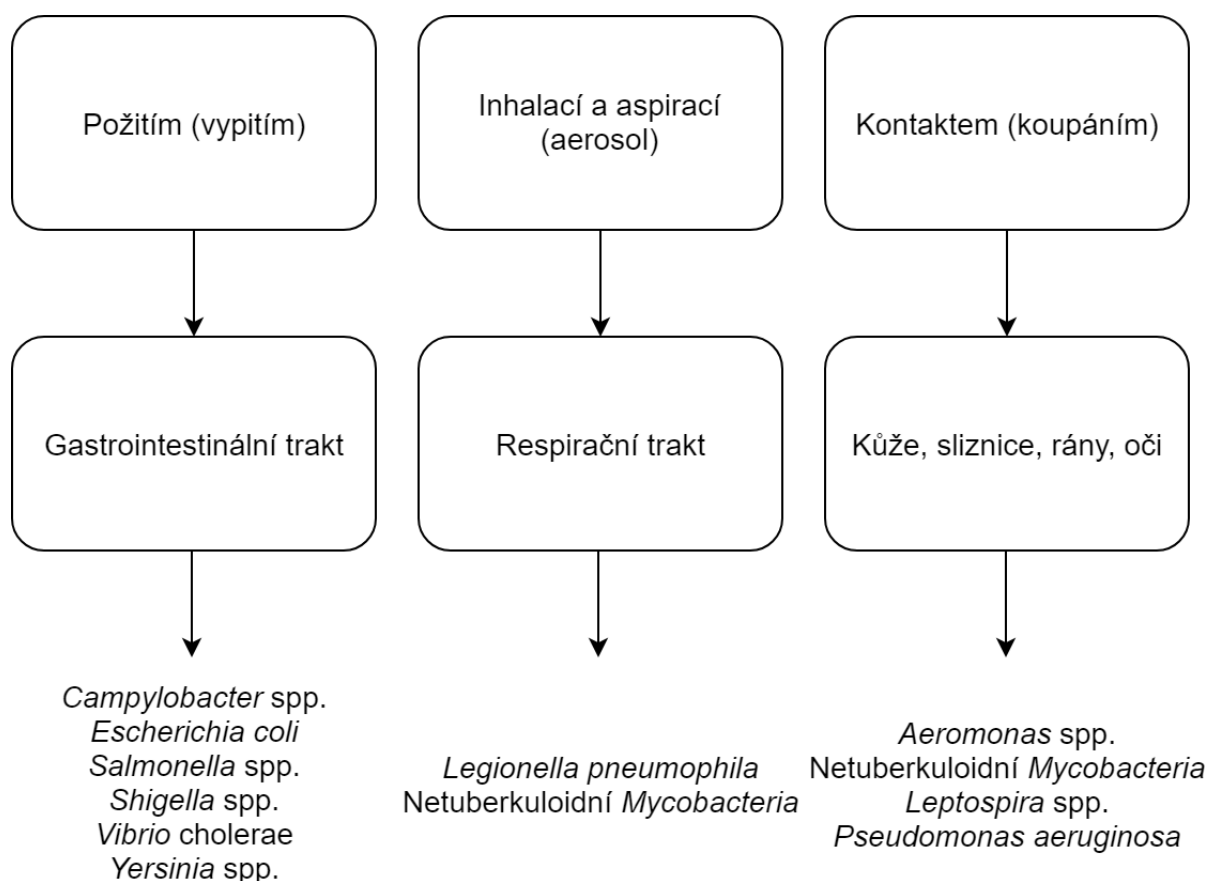
Dalšími biologickými nečistotami bývají řasy či sinice, které představují největší problém hlavně ve vodních nádržích.

Tabulka 2 – Hlediska dělení mikroorganismů (převzato a upraveno: WHO, 2004)

HLEDISKA			
Tvar	Koky	Tyčky	–
Buněčná stěna	Gram-pozitivní	Gram-negativní	–
Energie	Fotoorganotrofní	Chemoorganotrofní	–
Vztah ke kyslíku	Aerobní	Anaerobní (fakultativně anaerobní)	Mikroaerofilní
Způsob získávání živin	Autotrofní	Heterotrofní	–
Hygienický význam	Patogenní	Nepatogenní	Potenciálně patogenní
Původ v prostředí	Alochtonní	Autochtonní	–
Indikační schopnosti	Fekální znečištění	Organické znečištění	–

Tabulka 3 – Patogeny přenášené vodou (převzato a upraveno: WHO, 2004)

Bakteriální patogen	Zdravotní význam	Odolnost ve vodě	Odolnost vůči chlóru	Relativní infekčnost
<i>E. coli</i>	Vysoký	Mírná	Nízká	Nízká
<i>Legionella spp.</i>	Vysoký	Mnohonásobná	Nízká	Mírná
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Mírný	Mnohonásobná	Mírná	Nízká
<i>Salmonella typhi</i>	Vysoký	Mírná	Nízká	Nízká
<i>Shigella spp.</i>	Vysoký	Krátká	Nízká	Mírná
<i>Vibrio cholerae</i>	Vysoký	Krátká	Nízká	Nízká
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vysoký	Dlouhá	Nízká	Nízká
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Nízký	Mnohonásobná	Nízká	Nízká
Netuberkulózní mykobakterie	Nízký	Mírná	Vysoká	Nízká



Obrázek 7 – Cesty přenosu vodních bakterií (převzato a upraveno: WHO, 2004)

Patogenní bakterie se některými vlastnostmi odlišují od ostatních vodních mikroorganismů, např. patogeny se vyskytují ve slucích na nerozpuštěných látkách, napadení patogenem vede k infekci a patogeny jsou schopny množit se uvnitř hostitele (WHO, 2004). Patogenní mikroorganismus je schopen vyvolat vážná onemocnění u člověka, nejčastěji se jedná o velmi vážné střevní infekce (Kunc a Ottová, 1997). Některá velmi závažná onemocnění vyplývají z inhalace aerosolu, jedná se například o legionářskou nemoc způsobenou *Legionella* spp. U pacientů s oslabenou imunitou, u starších nebo velmi mladých lidí, u osob s popáleninami nebo rozsáhlými poraněními při požití vody nebo po koupání se mohou vyskytnout infekce kůže, očí, uší, nosu a krku. Původci těchto onemocnění jsou *P. aeruginosa*, *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. a *Serratia* spp.

3.1 Indikátorové bakterie

Indikátorové organismy se používají k testování mikrobiologického stavu vody a potravin. Jsou považovány za ukazatele bezpečnosti, hygienického stavu a kvality vody nebo životního prostředí. Výsledek mikrobiologického rozboru musí být posuzován ve vhodném kontextu, s ohledem na přirozenou mikrobiální ekologii, vnitřní a vnější chemické a fyzikální faktory, které by mohly ovlivnit růst patogenů. Optimální indikátor vody by měl mít následující vlastnosti: růstové vlastnosti indikátoru by měly být podobné jako u nebezpečných patogenů, měl by být vhodný pro veškeré druhy vod, jeho doba přežití by měla být stejná nebo vyšší jako u vodních mikroorganismů, měl by být přítomný v odpadních a znečištěných vodách ve větších koncentracích než fekální patogeny, měl by být stejně odolný vůči dezinfekcím jako vodní patogenní mikroby, měl by být snadno stanovitelný metodami jednoduchými, rychlými, levnými, citlivými a spolehlivými co nejpřesněji a co nejrychleji, měl by být stabilní a hlavně nepatogenní. Při běžném mikrobiologickém rozboru je nemožné stanovit veškeré potenciálně patogenní mikroorganismy, proto se používají mikroorganismy indikátorové, kdy jejich přítomnost odráží mikrobiologickou jakost vody. Indikátorové bakterie se dělí do dvou skupin – indikátory obecného znečištění a indikátory fekálního znečištění (Berger *et al.*, 2009a; Berger *et al.*, 2009b; Tortorello, 2003).

3.1.1 Indikátory obecného znečištění

Indikátory obecného organického znečištění, v cizojazyčné literatuře označovány jako HPC (heterotrophic plate count), využívající ke svému růstu organický uhlík, jsou uměle vytvořená skupina organotrofních mikroorganismů, do které patří bakterie, plísně a kvasinky. Tyto indikátory jsou schopny růst při dané teplotě na obohacených neselektivních půdách. Jelikož není možné zajistit optimální kultivační podmínky pro všechny dané mikroby, zjišťuje se pouze jejich podíl. Dle kvantitativního stanovení se posuzuje celkové znečištění vody. Vyšetření se provádí pouze kultivačními metodami. V rámci této skupiny dle požadavku na optimální růstovou teplotu kolem 20 °C a 37 °C se stanovují psychrofilní a mezofilní bakterie. Z důvodu zjištění účinnosti dezinfekce se stanovují mikroorganismy způsobující organické znečištění ve vodách (Bartram *et al.*, 2003; Pepper *et al.*, 2015; Allen *et al.*, 2004; Kunc a Ottová, 1997; Häusler, 1994; Ashbolt, *et al.* 2001; Ashbolt, 2004).

Psychrofilní bakterie jsou mikroorganismy patřící do skupiny organotrofních bakterií s teplotním optimem růstu okolo 20 °C. Tvoří kolonie na masopeptonovém agaru (MPA) po 72 hodinách (ČSN EN ISO 75 7842, ČSN EN ISO 83 0521). Kvantita slouží k informování o přítomnosti využitelných organických látek (Kunc a Ottová, 1991).

Mezofilní bakterie řazené do skupiny organotrofních bakterií a mající růstové optimum kolem 37 °C tvoří kolonie na neselektivním živném médiu po 48 hodinách. (ČSN EN ISO 75 7841, ČSN EN ISO 83 0521). Tyto bakterie získávají energii a dusík jenom z organických látek. Koncentrace těchto mikroorganismů poskytuje informace nejen o účinnosti desinfekčních prostředků, ale i o průběhu samočištění (ČSN EN ISO 75 7841; Kunc a Ottová, 1991).

Mikroorganismy – bakterie, kvasinky a plísně stanovené při teplotě 22 °C a 36 °C se kultivují na tryptonovém agaru s kvasničným extraktem, na kterém kolonie vyrostou po 48, popřípadě 72 hodinách (Häusler, 1994).

3.1.2 Indikátory fekálního znečištění

Voda, využívaná k přímé spotřebě nebo k rekreaci, musí být neustále sledována kvůli přítomnosti patogenních nebo podmíněně patogenních bakterií. Indikátory fekálního znečištění jsou takové mikroorganismy, které slouží ke zjišťování nezávadnosti vody a měly by splňovat následující kritéria – měly by být ve vysokém počtu přítomny ve výkalech člověka a teplokrevných zvířat, měly by být snadno zjistitelné metodami jednoduchými, měly by být nepatogenní a měly by být rezistentní k desinfekčním prostředkům (WHO, 2004; Tortorello, 2003). Indikátory fekálního znečištění jsou skupinou mikroorganismů zahrnující bakterie pocházející ze střev, jako jsou *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* apod (WHO, 2004). Nejvhodnějším indikátorem fekálního znečištění jsou bakterie *E. coli*, *Cl. perfringens* intestinální enterokoky, termotolerantní koliformní bakterie a další koliformní bakterie. Stanovení koliformních a termotolerantních koliformních bakterií se považuje za nejdůležitější kritérium čistoty vody (Tortorello, 2003; WHO, 2004; Colin *et al.*, 1988; Noble *et al.*, 2003).

Koliformní bakterie jsou skupinou střevních bakterií nejčastěji používanou jako indikátorové mikroorganismy (Alcama, 1999). Jedná se o gram-negativní nesporulující anaerobní tyčinky, mající negativní cytochromoxidázový test, tvořící za aerobních podmínek na selektivním médiu s laktózou kolonie během 24 hodin při teplotě 36 ± 2 °C za současné tvorby aldehydu nebo kyselin. Koliformní bakterie se určují tzv. ONPG testem, založený na stanovení aktivity β -D-galaktosidázy. Jedná se o enzym, který se jako první účastní štěpení laktózy. Dle schopnosti bakterií zkvašovat laktózu se dělí na laktóza-pozitivní a laktóza-negativní mikroby. Do této skupiny patří např. bakterie rodu *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* a *Klebsiella* (Stevens *et al.*, 2003; Baudišová, 2007; Cloete *et al.*, 2004).

Termotolerantní koliformní bakterie se používají nejen jako indikátory jakosti pitné vody a účinnosti dezinfekce, ale i jako ukazatel kvality povrchové vody. Gram-negativní aerobní nebo fakultativně anaerobní nesporulující tyčinky, mající negativní cytochromoxidázový test, tvořící za aerobních podmínek na selektivním médiu s laktózou kolonie během 24 hodin při teplotě 44 °C za současné tvorby aldehydu nebo kyselin. Tyto bakterie pochází z trávicího traktu, z průmyslových vod nebo z tlejících zbytků rostlin a z půd (WHO, 2004; Cloete *et al.*, 2004).

Intestinální enterokoky neboli fekální streptokoky jsou gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, pohyblivé mikroorganismy, vyskytující se jednotlivě nebo ve dvojicích. Pocházejí ze střevního traktu a z půd. Signalizují čerstvé znečištění vody. Do této skupiny patří *Enterococcus* (E.) *faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*. Enterokoky se používají jako indikátory fekálního znečištění. Způsobují záněty močových cest, sepse a meningitidy. Většina z nich se nemnoží ve vodním prostředí, ale přežívají v něm déle než koliformní a termotolerantní koliformní bakterie. Jsou odolnější vůči vysušení a dezinfekci. Enterokoky se stanovují metodou membránové filtrace s inkubací membrán na selektivních médiích při teplotě 35 – 37 °C po dobu 48 hodin a metodou přímého výsevu na povrch kultivačního média. Dále se provádí konfirmační testy, jako je katalázový test a důkaz hydrolýzy eskulinu. Do této skupiny patří i *Streptococcus* (Str.) *faecium*, *Str. faecalis* a *Str. avium* (WHO, 2004; Štěpánek, 1979; Frahm *et al.*, 2003). V tabulce 4 jsou uvedeny skupiny bakterií, které se nejčastěji izolují při stanovení celkového počtu bakterií (Mossel a Struijck, 2004).

Tabulka 4 – Skupiny bakterií, nejčastěji izolované při stanovení celkového počtu bakterií (převzato a upraveno: Mossel a Struijk, 2004)

Gram-negativní, nefermentující, tyčkovité bakterie	Gram-negativní, fermentující, tyčkovité bakterie	Gram-pozitivní bakterie
<i>Acinetobacter</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Bacillus</i>
<i>Burkholderia</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Enterococcus</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>Rahnella</i>	Kataláza-pozitivní koky
<i>Stenotrophomonas</i>		

3.2 Hygienicky významné organismy ve vodách

Vyskytují-li se hygienicky významné bakterie ve vodě, jedná se o vážné hygienické nebo epidemiologické závady. Do této skupiny patří různé, pro člověka patogenní bakterie, jejichž výskyt ve vodě je nežádoucí (Votava *et al.*, 2003). Jedná se o bakteriální rody *Aeromonas* (*A. hydrophila*, *A. punctata*), *Candida* (*C. Albicans*), *Legionella* (*L. pneumophila*, *L. moravica*), *Leptospira* (*Lept. biflexa*, *Lept. interrogans*), *Salmonella* (*S. typhi*, *paratyphi*), *Shigella* (*Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri*), *Staphylococcus* (*St. aureus*, *St. epidermidis*), *Streptococcus* (*Str. pyogenes*, *Str. pneumoniae*, *Str. bovis*), *Vibrio* (*V. cholerae*) a živočišné viry rodu *Enterovirus* (*Coxsackieviry*, *Echoviry*, *Polioviry*) (Votava *et al.*, 2003; Šilhánková, 2008; WHO, 2004).

Nejvýznamnější skupinou z hlediska hygienického jsou patogenní bakterie, které pochází z trávicího traktu člověka a teplokrevných zvířat. Patří sem mikroorganismy

z čeledi *Enterobacteriaceae*, jako jsou patogenní sérovary *E. coli*, shigely a salmonely, které snadno kontaminují vodní zdroje, ve kterých přežívají několik měsíců. Tyto bakterie představují potenciální zdroj nákazy jak pro člověka, tak pro zvířata. Fekální znečištění vody vzniká hlavně z žump, městských kanalizací, septiků, hnoje nebo jatek, které nejsou dostatečně zajištěny proti průniku do podzemních nebo povrchových vod.

Další hygienicky významnou skupinou jsou gram-pozitivní koky, kde je nejdůležitějším zástupcem *St. aureus*. Výskyt tohoto mikroorganismu se sleduje v bazénech, v saunách a na koupalištích, protože se jedná o původce různých pyogenních infekcí. Dále se sem řadí rod *Enterococcus*.

Gram-negativní nefermentující bakterie patří také mezi hygienicky významné bakterie. Tyto mikroorganismy se obvykle nachází ve vodě. Do této skupiny se řadí bakterie *Legionella* a *Pseudomonas*, které mohou být potenciálními patogeny pro děti, imunosuprimované osoby, nemocné a staré lidi.

Mezi hygienicky významné bakterie dále patří potenciálně patogenní atypické netuberkulózní mykobakterie, mezi hlavní zástupce řadíme *Mycobacterium (M.) avium*, *M. chelonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, a *M. xenopi*. Pro tyto mykobakterie je voda přirozeným prostředím, ve kterém se běžně vyskytují, proto se nachází nejen v pitné, ale i v povrchové a odpadní vodě (Vaerewijck *et al.*, 2005; Hruday *et al.*, 2003; Pell, 1997; Štěpánek *et al.*, 1979; Freiman *et al.*, 2004; WHO, 2004; Cloete *et al.*, 2004; Fields *et al.*, 2004).

Vodní patogeny jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 – Přehled hygienicky významných vodních patogenů (převzato a upraveno: Ashbolt, 2004)

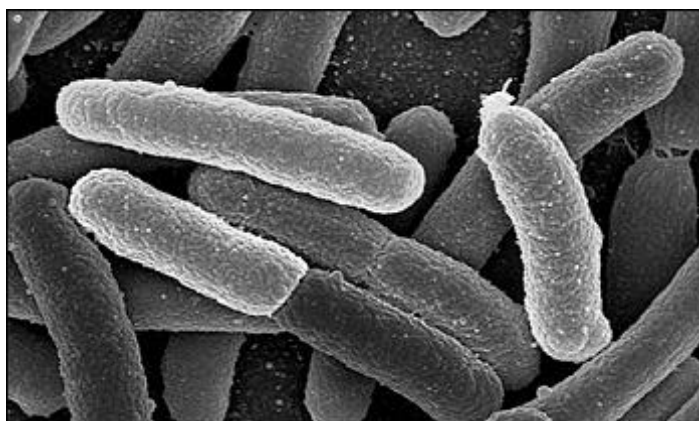
Bakterie	Onemocnění	Primární zdroje mikroorganismů
<i>Salmonella typhi</i>	Tyfoidní horečka	Lidské výkaly
<i>Salmonella paratyphi</i>	Paratyfoidní horečka	Lidské výkaly
<i>Shigella spp.</i>	Bakteriální úplavice	Lidské výkaly
<i>Vibrio cholerae</i>	Cholera	Lidské výkaly a sladkovodní plankton
Enteropatogenní <i>E. coli</i>	Gastroenteritida	Lidské výkaly
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritida	Lidské a zvířecí výkaly
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritida	Lidské a zvířecí výkaly
<i>Legionella pneumophila</i>	Legionelóza	Termální vody
<i>Leptospira spp.</i>	Leptospiróza	Lidské a zvířecí výkaly
<i>Mycobacteria</i>	Plicní onemocnění	Půda a voda

3.2.1 Gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky

E. coli

E. coli (obrázek 8) patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se gram-negativní, fakultativně anaerobní, pohyblivé tyčky, pro které je charakteristické zkvašování laktózy (na Endově agaru (EA) roste v kovově lesklých koloniích na tmavě růžovém agaru) za tvorby kyselin a plynu. Dále tvoří indol z aminokyseliny tryptofanu a nejsou schopny tvořit sirovodík. Metabolicky inaktivní kmeny *E. coli* jsou velmi podobné se *Shigella spp.*, se kterými se snadno zamění. Optimální teplota pro růst je 37 °C. *E. coli* jsou běžnou součástí trávicího traktu lidí a živočichů. Je tedy využívána jako indikátor fekální kontaminace vod. Patří mezi potenciálně patogenní bakterie vyvolávající oportunní infekce, nejčastěji infekce močových cest, ledvin, ran, plic a průjemová onemocnění. Patří mezi nozokomiální patogeny. Kmeny *E. coli* se dělí podle faktorů virulence do následujících skupin: enterotoxigenní (ETEC), enteropatogenní (EPEC), enterohemoragické (EHEC), enteroinvazivní (EIEC), enteroagregativní (EAEC), uropatogenní (UPEC) a shiga-like toxigenní (STEC) (Garrity *et al.*, 2005a; Garrity *et al.*, 2005b, Cloete *et al.*, 2004, Greenwood *et al.*, 1999) Původcem

tzv. cestovatelských průjmů jsou kmeny ETEC, které dále v rozvojových zemích způsobují těžké průjmy u dětí a novorozenců. ETEC produkují dva různé typy enterotoxinů – termostabilní (TS) a termolabilní (TL), který aktivuje adenylát-cyklázu zvyšující hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) ve střevních buňkách (enterocytech), což má za následek nadměrnou sekreci iontů a vody, projevující se jako vodnaté průjmy (Qadri *et al.*, 2005). Cestovatelské průjmy mohou způsobovat také kmeny EAEC (Mathewson *et al.*, 1985). Novorozenecké průjmy způsobují kmeny EPEC, kdy je nejčastějším sérovarem O126, O55 či O86 (DeVinney *et al.*, 1999). Krvavé průjmy doprovázené vysokými horečkami jsou vyvolané kmeny EIEC, které mají speciální plazmidově vázané faktory invazivity, pomocí nichž pronikají do enterocytů, ve kterých se intracelulárně množí, což má za následek poškození střevních buněk a vznik vředů či zánětů (Johnson a Nolan, 2009). Nejnebezpečnějšími kmeny jsou kmeny STEC, dříve označovány jako VTEC (verotoxigenní *E. coli*), kvůli produkci verotoxinu. Kmeny STEC a EHEC způsobují průjmy s příměsí krve a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Nejvýznamějším sérotypem je O157:H7 (Paton a Paton, 1998). Infekce močových cest vyvolávají kmeny UPEC (Cheasty a Smith, 2005; Garrity *et al.*, 2005a; Garrity *et al.*, 2005b, Cloete *et al.*, 2004, Greenwood *et al.*, 1999).



Obrázek 8 – *Escherichia coli* v elektronovém mikroskopu (převzato: Snyder, 2009)

Rod *Salmonella*

Jedná se o gram-negativní, tyčkovité, pohyblivé bakterie, taxonomicky řazené do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou pro člověka patogenní a jde o nejčastější původce alimentárních nákaz. Dělí se na primárně antropogenní, tedy přenosné z člověka na člověka, kam řadíme *S. typhi* a *S. paratyphi*, dále primárně zoonotogenní, kdy jsou

zvířata bacilonosiči, sem patří *S. enteritidis* a *S. typhimurium* (Pui *et al.*, 2011; D'Aoust *et al.*, 2007). Mezi charakteristickou biochemickou vlastnost patří produkce sirovodíku (H_2S). *Salmonella* spp. Nemá schopnost zkvašovat cukry, jako je laktóza, maltóza, glukóza či manitou. *Salmonelly* se dle Kauffmann-Whiteova schématu dělí do více než 2000 sérotypů, jedná se o dělení podle jejich antigenní struktury, tzn. podle somatického O-antigenu, bičíkovitého H-antigenu a kapsulárního Vi-antigenu (Garrity *et al.*, 2005b). Klinická manifestace infekcí, které jsou způsobeny *Salmonella* sp., lze rozdělit na základě čtyřech hlavních projevů, tedy tyfus/paratyfus, bakteriémie/septikémie, gastroenteritida a asymptomatické nosičství. Gastroenteritidy jsou vyvolané požitím kontaminované vody nebo potravy, protože se *Salmonelly* šíří fekálně-orální cestou a vyskytují se ve střevech zvířat, která se mohou nakazit z prostředí, jako je voda, vzduch nebo půda (Cotruvo *et al.*, 2004, Greenwood *et al.*, 1999). Klasickými diagnostickými metodami, které se v mikrobiologii využívají, jsou kultivační metody, kdy se používá XLD agar (xylulóza, lyzin, deoxycholát), Rambachův agar (chromogenní půda) nebo DC agar (deoxycholát, citrát) (obrázek 9). Dále se používají rychlé metody pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Při onemocnění se nasazuje antibiotická léčba – ampicilin, chloramfenikol (Crump *et al.*, 2008; Votava *et al.*, 2003).



Obrázek 9 – *Salmonella enteritidis* na DC agaru (patrná produkce H_2S) (převzato a upraveno: Kolínská, 2014)

Rod *Shigella*

Shigely (obrázek 10) jsou gram-negativní, fakultativně anaerobní, nepohyblivé, nesporulující, tyčkovité bakterie, které se vyskytují v gastrointestinálním traktu lidí a opic. *Shigella flexneri* a *Shigella dysenteriae* jsou velmi významnými patogeny, které u lidí způsobují bacilární úplavici, tzv. shigellózu. Leckteré kmeny produkují tzv. Shiga toxin (Sun *et al.*, 2011). Jsou málo biochemicky aktivní, je pro ně charakteristické zkvašování mannitolu a negativní indol (Sansonettil, 2010). Jedná se o fakultativně intracelulární patogeny kolonizující střevní sliznici, vyznačují se schopností pronikat do buněk tlustého střeva, kde se aktivně intracelulárně množí. K nakažení stačí velmi malá infekční dávka. Onemocnění se projevuje častým nutkáním na stolicí s příměsí hlenu, hnisu a krve, vedoucí k dehydrataci (Votava 2003; Warren *et al.*, 2006). Shigely se vyskytují v ČOV, kdy hrozí kontaminace vodních zdrojů (Sansonettil, 2010). Šíří se fekálně-orální cestou nebo přímým kontaktem s nakaženým jedincem (Sansonettil, 2010). K diagnostice se používá metoda PCR či elektroforéza. *Shigelly* se kultivují na běžných médiích (EA, XLD) (Votava, 2013; Bando *et al.*, 1998).



Obrázek 10 – *Shigella* spp. (převzato: BioCote, 2015)

Rod *Vibrio*

Rod *Vibrio* je zástupcem gram-negativních, pohyblivých, fakultativně anaerobních, zakřivených tyček (Farmer, 2005). Biochemicky málo aktivní, příkladem je pozitivní oxidáza či redukce dusičnanů na dusitany. Vyskytuje se převážně ve vodě (moře, ústí řek), kde jejich množství záleží na koncentraci sodíku a teplotě (Cabral, 2010).

Nejvýznamnějším představitelem je *V. cholerae* produkující cholera toxinu (enterotoxin) a vyvolávající onemocnění cholera, kdy k nakažení dochází požitím kontaminované vody nebo potravy a typickým projevem onemocnění jsou vodnaté průjmy a zvracení za současného vylučování vibrií. Následně dochází k silné dehydrataci a ke ztrátě elektrolytů (Votava *et al.*, 2003). Onemocnění se snadno léčí v podobě podávání tekutin, popřípadě antibiotik (Cabral, 2010).

Rod *Aeromonas*

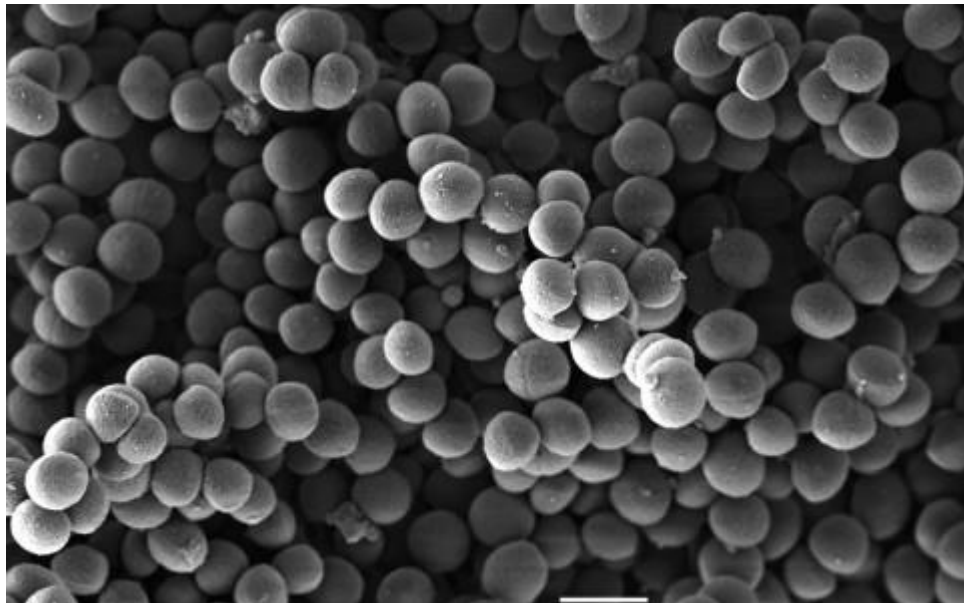
Nejvýznamnějším zástupcem rodu *Aeromonas* je *A. hydrophila*. Tento rod patří do čeledi *Aeromonodaceae* a je charakterizován jako gram-negativní, nesporulující, fakultativně anaerobní, pohyblivé tyčky. Mezi jeho biochemické vlastnosti patří produkce katalázy a oxidázy (Votava *et al.*, 2003; Hyus, 2014; Sartory, 2003). Vyskytuje se v půdě, v potravinách a ve vodě, kde je indikátorem fekálního znečištění. Pomocí faktorů virulence se udržuje na epitelech a na sliznici střev. Pomocí extracelulárních toxinů a enzymů vyvolává gastroenteritidy či infekce ran, oči nebo kloubů. Je nebezpečný hlavně u imunosuprimovaných jedinců (Abulhamd, 2009). K laboratorní diagnostice se používá krevní agar (KA), MacConkeyho agar, XLD agar či DC agar (Janda *et al.*, 2010). Při onemocnění způsobeným *A. hydrophila* se podává antibiotická léčba – gentamycin nebo chloramfenikol (Abulhamd, 2009).

3.2.2 Gram-pozitivní koky

Staphylococcus aureus

St. aureus (obrázek 11) patří mezi nejvýznamnější představitele koaguláza-pozitivních stafylokoků. Jedná se o nepohyblivé gram-pozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující koky. Mezi jejich biochemické vlastnosti patří, že jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Vyskytují se ve dvojicích a v nepravidelných shlucích, připomínající hrozen (Katzif *et al.*, 2005). Faktory virulence se dají rozdělit na faktory vázané na buněčnou stěnu (peptidoglykan, pouzdro, kyselina teichoová, povrchové adhezivní molekuly) a na extracelulární látky (volná koaguláza, kataláza, hyaluronidáza, lipáza, proteáza, nukleáza, fibrinolysin, enterotoxiny). *St. aureus* vytváří biofilm, který ho do určité míry chrání před účinky antibiotik a dezinfekcí (Chaignon *et al.*, 2007). Vyskytuje se u člověka i u zvířat, převážně na sliznicích a kůži. Jedná se o podmíněně patogenní bakterii (Mađar *et al.*, 2006). *St. aureus* je původcem pyogenních infekcí,

zánětů, abscesů, sinusitid nebo folikulitid (Greenwood *et al.*, 1999). Kultivace se provádí hlavně na KA, kde roste ve smetanových koloniích se zónou úplné hemolýzy. Dále se používá MPA (nazlátlé kolonie) nebo Baird-Parkerův agar (černé kolonie) (Corry *et al.*, 2003). K identifikaci se používají screeningové a biochemické testy (volná koaguláza, dekapsulací test) a molekulárně biologické metody (PCR). K léčbě se využívají antibiotika (oxacilin, kloxacilin) (Mařar *et al.*, 2006; Paulík *et al.*, 2005).



Obrázek 11 – *Staphylococcus aureus* v elektronovém mikroskopu při zvětšení 20 000 x (převzato: Baumann, 2014)

Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* náleží do čeledi *Enterococcaceae* (Sedláček, 2007). Enterokoky jsou gram-pozitivní, nesporulující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní koky, které jsou součástí střevní mikroflóry a ústní dutiny (Hardie a Whiley, 1997; Jett *et al.*, 1994). Důležitým faktorem virulence je schopnost tvořit biofilm, dále taky extracelulární (hydrolytické enzymy, cytolysin, hyaluronidáza) a povrchové (adheziny pouzdro) faktory virulence (Nannini a Murray, 2006; Cox *et al.*, 2005, Jett *et al.*, 1994). Enterokoky patří mezi oportunní patogeny, tzn. dojde-li k šíření enterokoků ze střev do jiných částí těla, dochází ke vzniku onemocnění (infekce močových cest, infekční endokarditida, urogenitální infekce). Léčba je pomocí antibiotik. Kultivace se provádí na KA nebo Slanetz-Bartley agaru. Diagnostikují se i pomocí PCR (Nannini a Murray, 2006).

3.2.3 Gram-negativní nefermentující bakterie

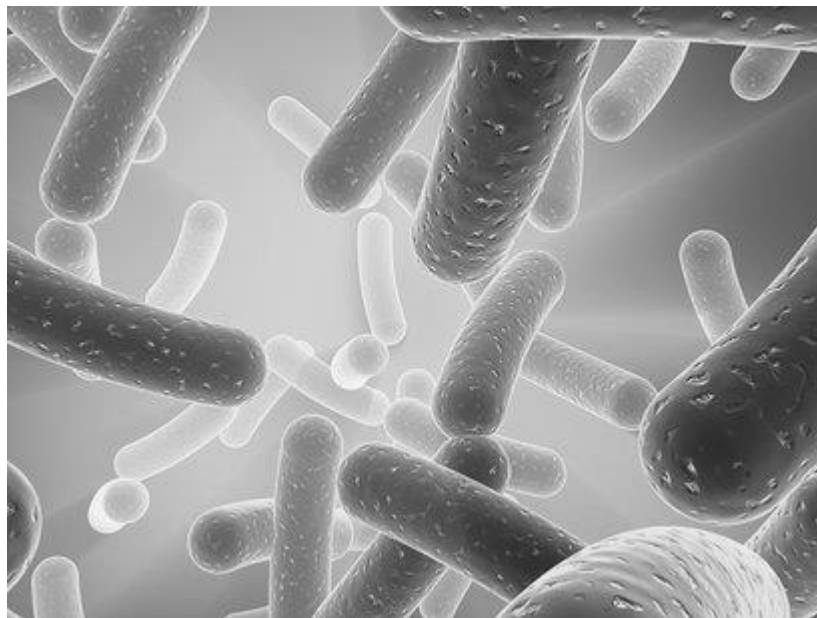
Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa je systematicky zařazena do čeledi *Pseudomonadaceae*. Jedná se o významný oportunní patogen. Morfologicky se řadí mezi gram-negativní, nefermentující, nesporulující, pohyblivé tyčky. Patří mezi oxidáza-pozitivní bakterie s chemoorganotrofním metabolismem. Je schopna růst v širokém rozmezí teplot od 4 °C do 40 °C. Kultivuje se na běžných kultivačních médiích (KA, EA). Na médiích roste v různých koloniích v závislosti na tom, z jakého materiálu je získaná. Pro *P. aeruginosa* je charakteristická jasmínová vůně a tvorba pigmentů – pyoverdin (zelený), pyocyanin (modrý), pyorubin (červený) a pyomelanin (hnědý). Běžně se vyskytuje ve vodě, ve vlhkých prostředích a v potravinách. Jsou vysoce odolné vůči dezinfekčním a antimikrobiálním látkám, kdy dokáží ve zředěných dezinfekcích přežít (Palleroni, 2005a; Palleroni, 2005b; Greenwood *et al.*, 1999, Garrity *et al.*, 2005b). Jsou nejčastějším původcem nozokomiálních nákaz, kdy jsou nebezpečné především pro imunosuprimované pacienty. Způsobují infekce močových cest, folikulitidy, osteomyelitidy či jiné infekce ran (Greenwood 1999). *P. aeruginosa* je přirozeně rezistentní k antibiotikům (β -laktamy, tetracykliny, makrolidy). K léčbě se tedy perorálně podává kotrimoxazol a parenterálně piperacilin, gentamycin a tobramycin (Driscoll *et al.*, 2007; Simon a Stille, 1998).

Legionella pneumophila

L. pneumophila (obrázek 12) patří do čeledi *Legionellaceae*. Jedná se o aerobní, pohyblivé, pleomorfní, nesporulující, gram-negativní tyčky. Pohyb zajišťuje jeden nebo více polárních bičíků. *Legionella pneumophila* způsobuje legionelózu. *Legionella* se přenáší kontaktem s kontaminovanou vodou, kdy nebezpečné jsou chladicí věže, zvlhčovače vzduchu, sprchy a vodovody. Může se jednat o nozokomiálního původce infekcí. Mají na svém povrchu různé struktury, které jsou velmi důležité pro jejich patogenitu. Bakterie se přichycují na hostitelskou buňku pomocí bičíků a pili, do které následně pronikají a dostávají se do makrofágů. Infekční dávka je velmi nízká, onemocnění vyvolá jediný organismus. Nejohroženější skupinou, u které mohou legionelózy vznikat, jsou oslabení pacienti, kteří inhalovali kontaminovanou vodu. Inspirace aerosolu vede k propuknutí plicního onemocnění. *L. pneumophila* se vyskytuje ve sladké vodě o různé teplotě, pH a obsahu kyslíku, dále také v půdě. *L. pneumophila*

má schopnost množit se uvnitř prvků, kteří jí poskytují ochranu před dezinfekčními prostředky a vysokými teplotami. Hlavní diagnostickou metodou je stanovení koncentrace protilátek v séru, koncentrace antigenu v moči nebo detekce bakterií ve sputu nebo v bronchoalveolární laváži. Dále se používají rychlé diagnostické metody jako je PCR a přímé fluorescenční barvení protilátek (DFA). Kultivuje se na BCYE agaru. *Legionella* způsobují legionelózy – pontiáckou horečku a legionářskou nemoc. Prevencí před legionelami je zabránění vstupu těchto mikrobů do vodovodního systému, dále udržování vysokých teplot ve vodovodním systému a zabránění zastavení cirkulace vody v potrubí. Metodou, která se využívá k čištění vody, je použití ozonu (málo účinný), chlordioxidu, monochloraminu (nejúčinnější) nebo ultrafialového záření (Bartram, 2007; Buchbinder *et al.*, 2002; Cordevant *et al.*, 2003; Steinert *et al.*, 2002; Blanc *et al.*, 2005).



Obrázek 12 – *Legionella pneumophila* v elektronovém mikroskopu (převzato: VirCell, 2014)

3.2.4 Potenciálně patogenní atypické (netuberkuloidní) mykobakterie

Rod *Mycobacterium* zařazujeme dle taxonomie do čeledi *Mycobacteriaceae*, do řádu *Actinomycetales*, třídy *Actinobacteria*, kmene *Actinobacteria*. Jedná se o bakterie s gram-pozitivním typem buněčné stěny i přesto, že se velmi špatně barví dle Grama. Používá se acidorezistentní barvení dle Ziehl-Neelsena. Mykobakterie jsou aerobní, nepohyblivé, nesporulující, tyčkovité, zakřivené nebo rovné bakterie tvořící vlákna, která se snadno rozpadají na koky a tyčky. Jsou acidorezistentní, jejich buněčná stěna obsahuje kyselinu mykolovou, galaktózu a arabinózu, díky nepropustné buněčné stěně jsou

rezistentní k dezinfekčním prostředkům, jako je např. chlór (Primm *et al.*, 2004; Sedláček, 2007). Netuberkulózní mykobakterie se většinou vyskytují v půdě nebo ve vodě (moře, řeky, studny). K rozvoji onemocnění ve většině případů nedochází, protože člověk je s nimi v kontaktu neustále. Jsou ale nebezpečné u imunodeficientních jedinců (Greenwood *et al.*, 2007). K identifikaci netuberkuloidních mykobakterií se používají molekulárně-biologické metody a testy potvrzující biochemickou aktivitu (Chemlal a Portaels, 2003).

3.2.5 Řasy a sinice

Z důvodu eutrofizace dochází k výraznému zhoršování kvality vody ve většině vodních nádrží. Příčinou je intenzivnější používání hnojiv, zvýšení splachů ze zemědělského povodí a zvýšený přísun fosforu, síry a dusíku, které pocházejí z odpadních vod (Hartman *et al.*, 2005; Jakrlová a Pelikán, 1999). Projevem je zvýšená produkce vodních květů řas (*Algae*) a sinic (*Cyanobacteria*), což má za následek rozkolísání koncentrace kyslíku a snížení průhlednosti vody. Postupně dochází k odumírání bakterioplanktonu nebo fytoplanktonu, kdy tlející organismy odebírají kyslík, což následně vede k úhynu ryb (Jakrlová a Pelikán, 1999).

Vodní květ bývá tvořen řasami *Botryococcus braunii* a sinicemi rodu *Microcystis*, *Anabaena* či *Gleotrichia*. Sinice se řadí mezi prokaryota, kdežto řasy mezi eukaryota. Jedná se o drobné organismy, kdy je jejich tělo tvořeno stélkou. Dalším rozdílem je, že řasy mají asilimilační barviva uložena v chromatoforech, načež sinice mají chlorofyl-a rozptýlen ve vnější plazmě na tylakoidech. Sinice jsou pouze fotoautotrofní organismy, přičemž řasy jsou schopny i mixotrofního způsobu výživy (Jakrlová a Pelikán, 1999; Kaštovský, 2018; Poulíčková a Jurčák, 2001; Maršálek *et al.*, 1996).

V rybnících je vodní květ do jisté míry žádoucí, protože vypovídá o eutrofizaci vody a dobrém přírůstku ryb. Naopak ve vodních nádržích je fytoplankton nežádoucí, jelikož ucpává filtry a následně zhoršuje kvalitu pitné vody. Největším problémem je, že řasy a sinice do okolí uvolňují biologicky aktivní látky, které následně ovlivňují fyzikální a chemické vlastnosti vody. Především se jedná o cyanotoxiny, což jsou toxiny sinic, které jsou však méně toxické než toxiny bakterií, ale toxičtější než toxiny vyšších rostlin. Cyanotoxiny jsou nebezpečné pro člověka a suchozemská zvířata. Jejich účinky jsou hepatotoxické, neurotoxické, cytotoxické, embryotoxické a dermatotoxické (Jakrlová a Pelikán, 1999; Kaštovský, 2018; Poulíčková a Jurčák, 2001; Maršálek *et al.*, 1996).

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na snižování biologické kontaminace ve vodách. Dalším cílem bylo provést laboratorní testy zaměřené na snižování biologické kontaminace ve vodách (např. pomocí fotokatalýzy, použitím peroxidu vodíku a SAVO original) a získané výsledky experimentů vyhodnotit a kriticky zhodnotit.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 MATERIÁL

5.1 Testované organismy

Fotokatalytické metody a působení peroxidu vodíku, titanové běloby či chlornanu sodného byly prováděny na zelených řasách rodu *Parachlorella*, druhu *Parachlorella kessleri*, CCALA 253 ze Sbírký kultur autotrofních organismů Třeboň, číslo kmene LARG 1.

Stejně metody byly dále prováděny na kvasinkách z rodu *Saccharomyces*, druhu *Saccharomyces cerevisiae*, z komerčně dodávaného produktu kvasinky vinné Boletus.

Jako zástupce bakterií byl použit referenční kmen *Escherichia coli* CCM 3954 z České sbírky mikroorganismů, Brno. Tento kmen byl pro dlouhodobé uchování uložen v kryozkumavkách v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

5.2 Přístroje

- Analytické váhy (Kern ABJ)
- Autokláv (Systém VX-40)
- Denzitometr Den – 1 (Biosan)
- Filtrační aparatura
- Fotokatalytické zařízení (obrázek 13)
 - o Skleněná kádinka s pracovním objemem 300 ml
 - o Magnetická míchačka (IKA colorsquid)
 - o Zdroj záření (UV-LED lampa CBM-120-UV-C14-FB365-21, firmy Luminus) Základní parametry dodané výrobcem – vložené napětí (3,6 V), provozní proud (9 A), vlnová délka záření (365 nm), tok záření (6,8 W), UV zdroj (12 x LED s životností 8 000 hodin)
- Horkovzdušný sterilizátor (Memmert)
- Chladnička (Gorenje, Electrolux)
- Mikroskop (Nikon Eclipse 80i s digitální kamerou DSFI-1)
- Magnetická míchačka s ohřevem (IKA RH Digital)
- Předvážky (Kern 440-49N)
- Termostat (Memmert)
- Ultrazvuková lázeň (Bandelin-Sonorex)

- UV lampa
- UV-VIS spektrofotometr (HACH LANGE DR 6000)
- Vortex (IKA lab dancer)

5.3 Laboratorní pomůcky

- Laboratorní sklo – odměrné válce (různé objemy), odměrné baňky (různé objemy), odměrné kádinky (různé objemy), Erlenmayerovy baňky (různé objemy), stříčky, automatické pipety (různé objemy), špičky, plastové Petriho misky, Bürkerova komůrka, krycí sklíčka, podložní sklíčka, plastové zkumavky (10 ml a 15 ml), kyvety, pinzety, filtr skleněná vlákna Fischer Scientific F227 70 mm (velikost pórů 0,3 μm), lžičky, váženky, plynový kahan, L-hokejky, jednorázové očkovací kličky (1 μl a 10 μl), pinzety, Büchnerova nálevka, vodní vývěva

5.4 Chemikálie a reagensie

V tabulce 6 je uveden seznam všech používaných chemikálií a reagensií pro přípravu roztoků a kultivačních médií.

Tabulka 6 – Seznam použitých chemikálií

Název	Vzorec	Výrobce
Aeroxide TiO ₂ P25	TiO ₂	Evonik industries
Destilovaná voda	H ₂ O	UPa
Dihydrogenfosforečnan draselný, p.a.*	KH ₂ PO ₄	Lach-Ner
Dusičnan kobaltnatý hexahydrát, p.a.	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Lachema
Dusičnan sodný, p.a.	NaNO ₃	Lach-Ner
Hydrogenfosforečnan draselný, p.a.	K ₂ HPO ₄	Lachema
Hydroxid draselný, p.a.	KOH	Penta
Chlorid manganatý tetrahydrát, p.a.	MnCl ₂ ·4H ₂ O	Merck
Chlorid sodný, p.a.	NaCl	Lach-Ner
Chlorid vápenatý hexahydrát, p.a.	CaCl ₂ ·6H ₂ O	Lach-Ner
Kyselina boritá, p.a.	H ₃ BO ₃	Lach-Ner
Kyselina chlorovodíková	HCl	Penta
Kyselina sírová 96%, p.a.	H ₂ SO ₄	Penta
Methanol, p.a.	CH ₃ OH	VWR chemicals
Methylenová modř (pH = 4,6)	C ₁₆ H ₁₈ N ₃ SCl	Penta
Molybdenan sodný dihydrát	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	Lach-Ner
Peroxid vodíku 30%, p.a.	H ₂ O ₂	Lach-Ner
SAVO original	NaClO (1 – 5 %) + NaOH (0,1 – 1 %)	Unilever
Síran hořečnatý heptahydrát, p.a.	MgSO ₄ ·7H ₂ O	Lachema
Síran měďnatý pentahydrát, p.a.	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Lachema
Síran zinečnatý heptahydrát, p.a.	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Penta
Síran železnatý heptahydrát, p.a.	FeSO ₄ ·7H ₂ O	Lach-Ner

*p.a. – čistota chemikálií „pro analýzu“

5.5 Kultivační média a roztoky

SA – Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia, Indie)

Pro kultivaci kvasinek, plísní a acidotolerantních bakterií. Složení je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 7 – Složení Sabouraud Dextrose agar

Složení	Gramů / litr
Mykologický pepton	10,0
Dextrosa	40,0
Agar	15,0
Konečné pH (při 25 °C 5,6 ± 0,2)	

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 65,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Směs byla zahřívána do úplného rozpuštění. Dále byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a po vychladnutí byla směs nalévána do plastových sterilních Petriho misek. Takto připravené půdy byly uchovány v chladničce při teplotě 5 °C.

MPA – Masopeptonový agar (HiMedia, Indie)

Obecně použitelné kultivační médium, jehož složení je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8 – Složení Masopeptonového agaru

Složení	Gramů / litr
Masový pepton	10,0
Hovězí extrakt	10,0
Chlorid sodný	5,0
Agar	15,0
Konečné pH (při 25 °C 7,2 ± 0,2)	

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 40,0 g přípravku do 1000 ml destilované vody. Směs byla sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a po vychladnutí byla směs nalévána do plastových sterilních Petriho misek. Takto připravené půdy byly uchovány v chladničce při teplotě 5 °C.

MPB – Masopeptonový bujon (HiMedia, Indie)

Jedná se o agar obohacený bujonem, na kterém se pěstují nenáročné bakterie. Složení MPB je uvedeno v tabulce 9

Tabulka 9 – Složení Masopeptonového bujonu

Složení	Gramů / liter
Masový extrakt (sušina)	10,0
Pepton pro bakteriologii	10,0
Chlorid sodný	5,0
Konečné pH (při 25 °C 7,2 ± 0,2)	

Příprava: Dle pokynů výrobce bylo naváženo 25,0 g MPB do vhodné sterilní nádoby a následně bylo přidáno 1000 ml destilované vody. Směs byla ve vhodných lahvích sterilizována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po sterilizaci a po vychladnutí byla směs uchovávána v chladničce při teplotě 5 °C.

Zásobní kultura kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*

Do sterilní Erlenmayerovy baňky byly přidány 2 litry převařené vychladlé vody. Obsah sáčku 0,6 g (komerčně dodávané sušené kvasinky vinné Boletus) byl vysypán do 2 l převařené vody. Dále bylo do Erlenmayerovy baňky přidáno 1,6 g živné soli pro kvasinky (komerčně dodávaná Vínka Živná sůl pro kvasinky). Následně bylo přidáno 28 ± 0,5 g cukru krystal. Zásobní kultura byla vložena na magnetické míchadlo, aby bylo docíleno úplné homogenizace. Erlenmayerova baňka byla zakrytá víčkem, aby bylo zamezeno případné kontaminaci vzorku. Celá zásobní kultura byla zahřívána na 30 ± 2 °C a inkubována za stálého míchání 48 hodin.

Živný roztok pro řasy

Zásobní roztoky pro přípravu živného roztoku byly připraveny podle tabulky 10. Následně byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Živný roztok byl připraven smícháním 10 ml každého roztoku ze zásobního roztoku ZR I a po 1 ml z každého roztoku ze zásobního roztoku ZR II – III a doplněn destilovanou na 1 l.

Tabulka 10 – Zásobní roztoky solí pro přípravu živného roztoku pro řasy

Zásobní roztok (ZR)	Chemikálie	Koncentrace v ZR [g/1000ml]
ZR I	NaNO ₃	25
	CaCl ₂ ·6H ₂ O	3,72
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,5
	K ₂ HPO ₄	7,5
	NaCl	2,5
	KH ₂ PO ₄	17,5
ZR II	EDTA + KOH	50 (Chelaton III) + 31 (KOH)
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	4,98
	+ H ₂ SO ₄	1 ml
	H ₃ BO ₃	11,42
ZR III (roztok mikroprvků)	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,82
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,44
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,242
	Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,49
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1,57

Zásobní kultura řas

Byla připravena zásobní kultura řas v živném roztoku. Do 1 litru živného roztoku bylo přidáno 300 ml řas. Do sterilní Erlenmayerovy baňky se zásobní kulturou řas bylo vloženo míchadlo a kultura byla vložena na magnetické míchadlo, aby došlo k homogenizaci zásobní kultury. Hrdlo Erlenmayerovy baňky bylo zakryto buničitou vatou, aby se zabránilo případné kontaminaci. Zásobní kultura byla inkubována vždy 2 týdny pod stálým umělým osvětlením (4 výbojky po 18 W) při laboratorní teplotě (27 ± 2 °C).

Příprava fyziologického roztoku

Byl připraven 1 litr fyziologického roztoku pro ředění mikrobiální kultury. Do 1 litru destilované vody bylo přidáno 9 g NaCl. Roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Příprava bakteriální kultury

Bakteriální kultura byla připravena oživením dlouhodobě skladované kultury *E. coli* v kryozkumavkách. Následně byla inkubována 24 hod při 30 °C, poté byla přeočkována na nové médium (MPA, MPB) a opět inkubována 24 hod při 30 °C. Takto připravené kultury na MPA byly uloženy do chladničky, kde byly při teplotě 5 °C uchovávány pro další manipulaci. Kultury v MPB byly neustále v termostatu při 30 °C, z této kultury bylo vždy odebráno určité množství, které bylo dále ředěno destilovanou vodou, aby se docílilo požadovaného zákalu. Čistá bakteriální kultura byla pak dále doplněna čistým MPB a vložena do termostatu, kde byla uchovávána při teplotě 30 °C.

6 PRACOVNÍ POSTUPY

6.1 Stanovení koncentrace chlorofylu-a

Metodu stanovení koncentrace chlorofylu-a specifikuje norma ČSN EN ISO 10260. Z této normy vycházel pracovní postup, při kterém byla stanovena koncentrace chlorofylu-a. Roztok řas byl důkladně míchán na magnetickém míchadle. Bylo odebráno 10 ml vzorku řas. Vzorek byl zfiltrován za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm. Filtr byl vysušen sáním, nastříhán na kousky a následně byl umístěn do plastové 15 ml zkumavky. Do zkumavky s kousky filtru bylo napipetováno 10 ml methanolu. Suspenze byla extrahována přes noc, kdy byla zkumavka uchovávána v chladničce. Extrahovaná kaše byla zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm do kalibrované zkumavky (15 ml). Vždy bylo odměřeno 9 ml extraktu. Po extrakci následovalo fotometrické měření. Část extraktu (2 ml) byla převedena do kyvety a proměřena na spektrofotometru. Z důvodu, že by extrakt mohl být zakalen, byla absorbance měřená při vlnové délce 665 nm korigována na základě odečtením absorbance změřené při vlnové délce 750 nm. Byla tedy změřena absorbance při vlnové délce 665 nm (A_{665}) a 750 nm (A_{750}) proti srovnávací kyvetě naplněné methanolem. Část extraktu (7 ml) bylo okyseleno přidávkem 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána. Po 10 minutách byla změřena absorbance znovu při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Koncentrace chlorofylu-a (ρ_c) v miligramech na litr byla vypočítána z rovnice 2. Během extrakce nesměly být vzorky vystaveny přímému světlu nebo vzduchu, protože by mohlo dojít k oxidačnímu nebo fotochemickému rozkladu, jelikož je chlorofyl citlivý na světlo a kyslík.

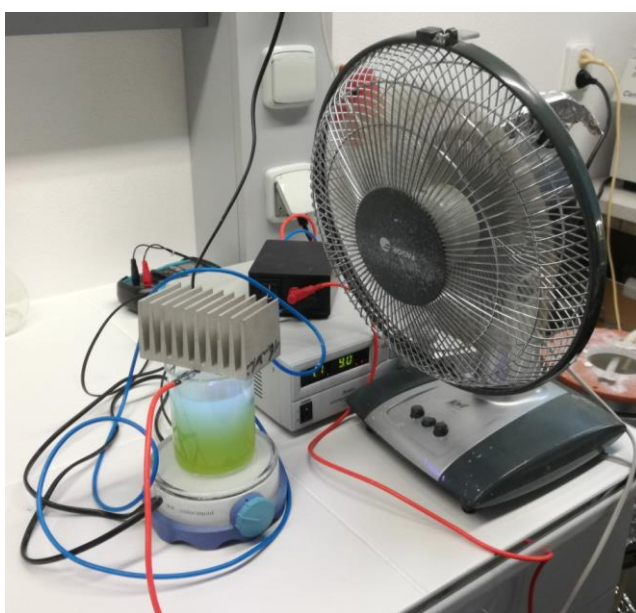
$$\rho_c = \frac{(A - A_a)}{K_c} \cdot \frac{R}{(R-1)} \cdot \frac{10^3 \cdot V_e}{V_s \cdot d} \quad (2)$$

kde $A = A_{665} - A_{750}$ je absorbance extraktu před okyselením, $A_a = A_{665} - A_{750}$ je absorbance extraktu po okyselení, V_e je objem extraktu v ml (10 ml), V_s je objem měřeného vzorku v l (0,3 l), $K_c = 82 \text{ l}/\mu\text{g} \cdot \text{cm}$ je pracovní spektrální absorpční koeficient chlorofylu-a, $R = 1,7$ je poměr A/A_0 pro roztok čistého chlorofylu-a, který je převeden na feofytin okyselením, d je optická dráha kyvety v cm (1 cm), 10^3 je přepočítávací faktor přízpusobený V_e . Ostatní řasové pigmenty (chlorofyl-b, chlorofyl-c) nebyly do stanovení

zahrnutý, protože příspěvek chlorofylu-b a chlorofylu-c k absorpci při vlnové délce 665 nm je zanedbatelný.

6.2 Postup odstraňování řas pomocí fotokatalýzy

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Následně byla na analytické váze navážena různá navážka fotokatalyzátoru TiO_2 (0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,25 g/l, 0,5g/l, 0,75g/l, 1 g/l, 1,25 g/l, 1,5 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l). Navážka byla přidána ke vzorku řas. Po důkladném rozmíchání bylo odebráno 10 ml vzorku ($t = 0$ min). Do kádinky se vzorkem bylo vloženo míchadlo a byla spuštěna UV-LED lampa. V určených časových intervalech (15 min) byly odebírány další vzorky k analýze. Analýza trvala 150 min. Vzorky byly zfiltrvány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm . Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm . Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byla získána koncentrace chlorofylu-a v miligramech na litr.



Obrázek 13 – Aparatura pro fotokatalytickou degradaci řas (autor)

6.3 Postup odstraňování řas pomocí H₂O₂

6.3.1 Postup odstraňování řas pomocí H₂O₂

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Vzorek byl vložen na magnetické míchadlo. Následně bylo napipetováno přesné množství 9,79 mol/l H₂O₂ (0,1 ml, 0,3 ml, 0,5 ml, 0,7 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 3 ml). Po přidání H₂O₂ byl odebrán vzorek (10 ml) v čase 0 min. Po 15 minutách byly odebírány další vzorky. Poslední vzorek byl odebrán po 150 minutách. Vzorky řas byly zfiltrovány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm. Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm. Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byly získány koncentrace chlorofylu-a v mg/l.

6.3.2 Postup odstraňování řas pomocí fotolýzy s přidavkem H₂O₂

Do sterilní skleněné kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Vzorek byl vložen na magnetické míchadlo. Následně bylo napipetováno přesné množství 9,79 M H₂O₂ (0,1 ml, 0,3 ml, 0,5 ml, 0,7 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml, 3 ml). Po přidání H₂O₂ bylo odebráno 10 ml vzorku (t = 0 min) a byla zapnuta UV-LED lampa. Každých 15 minut byly odebírány další vzorky. Analýza byla ukončena po 150 minutách. Vzorky řas byly zfiltrovány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm. Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μm. Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byly získány koncentrace chlorofylu-a v mg/l.

6.4 Postup odstraňování řas pomocí SAVO original

6.4.1 Postup odstraňování řas pomocí SAVO original

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Vzorek byl vložen na magnetické míchadlo. Bylo napipetováno přesně dané množství SAVO original, kde účinnou látkou je NaClO (6 µl, 12 µl, 24 µl, 48 µl, 96 µl, 192 µl, 384 µl). Po přidavku SAVO original byl odebrán první vzorek. Další vzorky byly odebírány po 15 minutách. Analýza byla ukončena po 150 minutách. Vzorky řas byly zfiltrovány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 µm. Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 µm. Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byly získány koncentrace chlorofylu-a v mg/l.

6.4.2 Postup odstraňování řas pomocí fotolýzy s přidavkem SAVO original

Do sterilní skleněné kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Vzorek byl vložen na magnetické míchadlo. Bylo napipetováno přesně dané množství SAVO original, kde účinnou látkou je NaClO (12 µl, 24 µl, 48 µl). Po přidavku SAVO original byl odebrán první vzorek. Následně byla zapnuta UV-LED lampa. Další vzorky byly odebírány po 15 minutách. Analýza byla ukončena po 150 minutách. Vzorky řas byly zfiltrovány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 µm. Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 µm. Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byly získány koncentrace chlorofylu-a v mg/l.

6.4.3 Postup odstraňování řas pomocí fotokatalýzy s přidavkem SAVO original

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku řas. Vzorek byl vložen na magnetické míchadlo. Bylo napipetováno přesně dané množství SAVO original, kde účinnou látkou je NaClO (12 μ l, 24 μ l, 48 μ l). Dále bylo naváženo 1 g/l TiO₂ (0,3 g/300ml). Po přidavku SAVO original a TiO₂ byl odebrán první vzorek. Následně byla zapnuta UV-LED lampa. Další vzorky byly odebírány po 15 minutách. Analýza byla ukončena po 150 minutách. Vzorky řas byly zfiltrvány za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μ m. Vysušený a na kousky nastříhaný filtr byl vložen do 15 ml zkumavky, do které bylo následně napipetováno 10 ml methanolu. Směs byla přes noc extrahována v chladničce. Druhý den byla směs opět zfiltrována za sníženého tlaku filtrem ze skleněných vláken s velikostí pórů 0,3 μ m. Část extraktu (2 ml) byla převedena do plastové kyvety a změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Zbylá část extraktu (7 ml) byla okyselena 0,01 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l. Směs byla důkladně protřepána a po 10 minutách byla znovu změřena absorbance při vlnové délce 665 nm a 750 nm. Hodnoty byly dosazeny do rovnice 2, ze které byly získány koncentrace chlorofylu-a v mg/l.

6.5 Postup kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur

6.5.1 Přímé stanovení počtu buněk

K přímému stanovení počtu kvasinek byla použita přímá mikroskopie, kdy byly počítány počty živých buněk v preparátu ze vzorku. Touto metodou lze získat i počty mrtvých buněk. Před samotným odstraňováním byl připraven zásobní roztok kvasinek o zákalu $4 \pm 0,5$ McFarland. Z tohoto zásobního roztoku bylo odměřeno 300 ml do sterilní skleněné kádinky, která byla vložena na magnetické míchadlo. Následně byl odpipetován 1 ml vzorku. Dále bylo přidáno určité množství SAVO original (12 μ l, 24 μ l, 48 μ l). Každých 15 minut byl odebírán 1 ml vzorku. Všechny vzorky byly ihned po odběru počítány v Bürkerově komůrce. Byla připravena směs – 20 μ l vzorku smícháno s 20 μ l methylenové modři o pH 4,6. Do prostoru mezi krycím sklíčkem a jamkou Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 10 μ l směsi. Byl použit světelný mikroskop. Byly počítány živé buňky kvasinek v 80-ti čtvercích. Následně byl počet buněk přepočítán na počet kvasinek v 1 ml dle rovnice 3.

$$\text{počet buněk v 1 ml} = \frac{\text{součet buněk}}{\text{počet čtverců}} \cdot 250 \cdot 1000 \quad (3)$$

250 převod z mm² na mm³

1000 získá počtu buněk v 1 ml

6.5.2 Nepřímé stanovení počtu buněk plotnovou metodou

Výsledky kvantitativního hodnocení nárůstu mikrobiálních kultur (kvasinky, bakterie) je počet CFU/ml. Toto hodnocení vychází z normy ČSN EN ISO 8199. Základem tohoto hodnocení je počítání narostlých kolonií na kultivačních médiích. Při tomto stanovení se postupovalo následovně. V prvním kroku byl připraven zásobní roztok kvasinek o zákalu $4 \pm 0,1$ McFarland a zásobní roztok bakterie *E. coli* o požadovaném zákalu. Ze zásobního roztoku bylo odměřeno 300 ml do sterilní skleněné kádinky. Byly odebrány 2 ml vzorku kvasinek/bakterií. 100 μ l z tohoto vzorku bylo aplikováno na kultivační médium (SA, MPA) a dále 1 ml tohoto vzorku byl postupně ředěn desítkovým ředěním, a to 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Do sterilních zkumavek bylo napipetováno 9 ml sterilního fyziologického roztoku, do 1. zkumavky byl napipetován 1 ml odebraného vzorku *Saccharomyces cerevisiae* / *E. coli*, obsah zkumavky byl důkladně promíchán, z této zkumavky byl odebrán 1 ml a napipetován do 2. zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku, obsah promíchán a znovu 1 ml přenesen do 3. zkumavky, tímto způsobem se postupovalo až do konečného ředění (obrázek 14). Dalším krokem bylo očkování. Petriho misky s SA/MPA byly řádně popsány. Z každé zkumavky s ředěním 10^0 až 10^{-10} byl očkovan objem 0,1 ml suspenze na 1 misku, byly očkovány 2 misky od každého ředění. Napipetovaný objem byl rozetřen sterilní L-hokejkou krouživým pohybem po celém povrchu agaru. Při pipetování bylo dbáno, aby byly misky při roztírání co nejméně otevřeny, aby se zabránilo případné kontaminaci. Misky byly kultivovány dnem vzhůru při teplotě 30 °C. Byly odečítány po 24 hod, 48 hod a po 5 dnech. V závislosti na jejich počtu byl použit následující vzorec (rovnice 4), kdy byly k hodnocení vybrány dvojice misek s nejvhodnějším ředěním (takové ředění, kde narostlo 15 – 150 kolonií kvasinek a 15 – 300 kolonií *E. coli*), byly spočítány počty kolonií na obou miskách tohoto ředění. Výsledkem je hodnota CFU/ml, tedy počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii, tedy počet buněk v 1 ml.

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d} \quad (4)$$

N CFU = počet bakterií schopných tvořit jednu kolonii

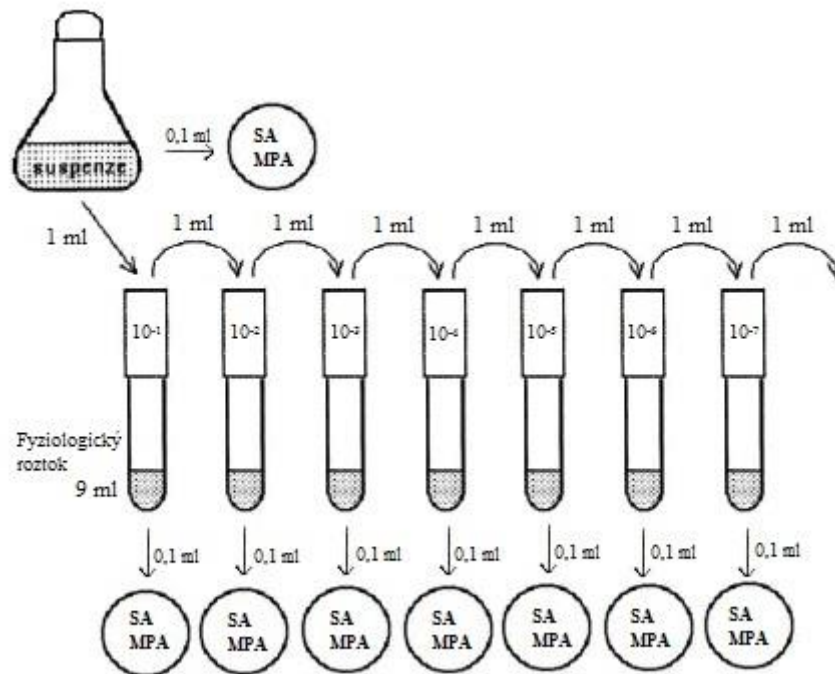
$\sum c$ součet všech kolonií spočítaných na vybraných miskách

n_1 počet misek použitých pro výpočet z prvního použitého ředění

n_2 počet misek použitých pro výpočet z druhého použitého ředění

d faktor pro výpočet prvního použitého ředění

V objem inokula očkovaného na každou z ploten



Obrázek 14 – Nákres postupu ředění kultury a následné očkování na médium (převzato a upraveno: MUNI, 2012)

6.6 Postup odstraňování kvasinek pomocí fotokatalýzy

Do sterilní skleněné kádinky bylo ze zásobního roztoku o zákalu $4 \pm 0,5$ McFarland odměřeno 300 ml vzorku kvasinek. Z toho vzorku byly odebrány 2 ml a zpracovány dle kap. 6.5.2. Do vzorku kvasinek bylo následně přidáno určité množství titanové běloby (1 g/l, 3 g/l). Toto množství bylo zvoleno dle závislosti odstraňování řas z vody. Dále bylo do kádinky vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo, po řádném rozmíchání TiO_2 byla následně spuštěna UV-LED lampa. Každých 30 minut byly

odebírány 2 ml vzorku. Všechny odebrané vzorky byly vždy ihned po odběru opět zpracovány dle kap. 6.5.2. U této metody nebylo možné používat přímé stanovení počtu buněk pomocí počítání v Bürkerově komůrce za použití světelné mikroskopie z důvodu, že po smíchání methylenové modři se vzorkem kvasinek, který již obsahovat TiO_2 , byly kvasinky v mikroskopu špatně viditelné.

6.7 Postup odstraňování kvasinek pomocí H_2O_2

Do sterilní skleněné kádinky bylo ze zásobního roztoku o zákalu $4 \pm 0,5$ McFarland odměřeno 300 ml vzorku kvasinek. Z toho vzorku byly odebrány 2 ml a zpracovány dle kap. 6.5.2. Hodnocení původního vzorku se provádělo z důvodu kontroly, zda zákal 4 McFarland odpovídá stále stejnému počtu buněk. Do vzorku kvasinek bylo vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo. Následně bylo přidáno určité množství 9,79 M H_2O_2 (1 ml, 3 ml, 6 ml). Toto množství bylo zvoleno dle závislosti odstraňování řas z vody. Po přidání H_2O_2 byly odebrány 2 ml vzorku ($t = 0$ min). Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku. Všechny odebrané vzorky byly vždy ihned po odběru opět zpracovány dle kap. 6.5.2.

6.8 Postup odstraňování kvasinek pomocí SAVO original

Do skleněné sterilní kádinky bylo ze zásobního roztoku o zákalu $4 \pm 0,5$ McFarland odměřeno 300 ml vzorku kvasinek. Z toho vzorku byly odebrány 2 ml a zpracovány dle kap. 6.5.2. Do vzorku kvasinek bylo vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo. Následně bylo přidáno určité množství SAVO original (12 μl , 24 μl a 48 μl), kde účinnou látkou je NaClO . Toto množství bylo zvoleno dle závislosti odstraňování řas z vody. Po přidání SAVO original byly odebrány 2 ml vzorku ($t = 0$ min). Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku. Všechny odebrané vzorky byly vždy ihned po odběru opět zpracovány dle kap. 6.5.2. Současně byly vzorky hodnoceny i pod světelným mikroskopem, kdy se přímo stanovoval počet živých buněk dle kap. 6.5.1. Tuto metodu přímého stanovení bylo možno použít, protože živé kvasinky byly pod mikroskopem dobře rozpoznatelné.

6.9 Postup odstraňování *E. coli* pomocí fotokatalýzy

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku *E. coli* o zákalu 0,5 McFarland. Z tohoto vzorku byly odebrány 2 ml, které byly dále zpracovány dle kap. 6.5.2. Do kádinky bylo vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo. Dále bylo přidáno určité množství titanové běloby (1 g/l, 3 g/l). Po řádném rozmíchání byla následně zapnuta UV-LED lampa. Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku, které byly ihned po odběru zpracovány dle kapitoly 6.5.2.

Dále byl proveden experiment, kdy bylo odměřeno stejné množství vzorku o stejném zákalu, ale bylo přidáno 1 g/l titanové běloby a 1 ml peroxidu vodíku. Do kádinky bylo vloženo míchadlo a kádinka byla vložena na magnetické míchadlo a následně byla zapnuta UV-LED lampa. Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku, které byly ihned zpracovány dle kap. 6.5.2.

6.10 Postup odstraňování *E. coli* pomocí H₂O₂

Do skleněné sterilní kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku *E. coli* o zákalu 0,3 McFarland. Z tohoto vzorku byly odebrány 2 ml, které byly dále zpracovány dle kap. 6.5.2. Do kádinky bylo vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo. Dále bylo přidáno určité množství peroxidu vodíku (1 ml, 3 ml, 6 ml). Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku, které byly ihned po odběru zpracovány dle kapitoly 6.5.2.

6.11 Postup odstraňování *E. coli* pomocí SAVO original

Do sterilní skleněné kádinky bylo odměřeno 300 ml vzorku *E. coli* o zákalu 0,2 McFarland. Z tohoto vzorku byly odebrány 2 ml, které byly dále zpracovány dle kap. 6.5.2. Do kádinky bylo vloženo míchadlo a kádinka byla umístěna na magnetické míchadlo. Dále bylo přidáno určité množství SAVO original (192 µl a 384 µl). Každých 30 minut byly odebírány 2 ml vzorku, které byly ihned po odběru zpracovány dle kapitoly 6.5.2.

7 VÝSLEDKY A JEJICH DISKUZE

7.1 Stanovení chlorofylu-a

Při fotokatalytickém odstraňování vzorku řas byla sledována závislost poklesu koncentrace chlorofylu-a v čase. Pro měření koncentrace byla zvolena UV/VIS spektrofotometrie.

Při experimentech se porovnávaly koncentrace chlorofylu-a, kdy bylo odebráno 20 ml vzorku. Nejdříve bylo stanoveno 10 ml vzorku a dalších 10 ml vzorku bylo stanoveno po 24 hodinách.

Tabulka 11 – Hodnoty koncentrace chlorofylu-a v $t = 0$ min a $t = 24$ hod

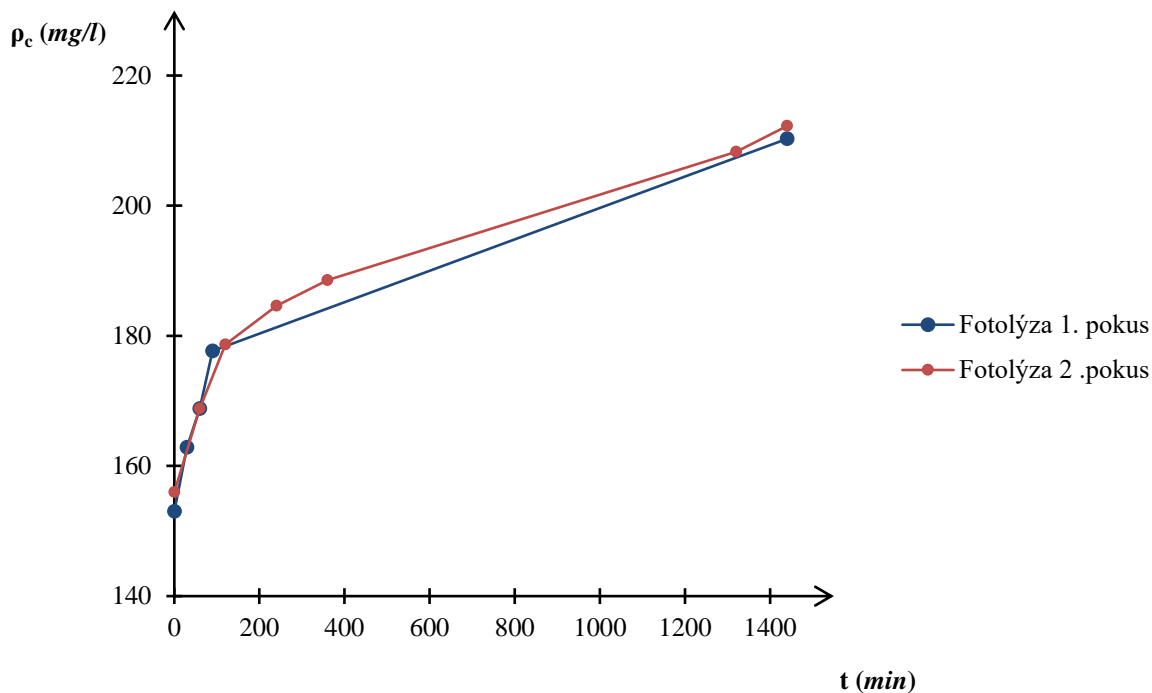
Číslo experimentu	Koncentrace chlorofylu-a v $t = 0$ min	Koncentrace chlorofylu-a v $t = 24$ hod
1.	154,01	154,99
2.	154,99	154,99
3.	154,99	154,99

Z výsledku experimentů (tabulka 11) vyplývá dobrá reprodukovatelnost všech tří stanovení, a to jak v čase $t = 0$ min, tak po $t = 24$ hodin. Můžeme dále konstatovat, že při vhodném uchování vzorku (chlad, temno) je možné provádět stanovení i po 24 hodinách bez ovlivnění výsledků.

7.2 Fitolýza

Při experimentech, kdy byla použita UV-LED lampa, byla u vzorku řas sledována závislost nárůstu koncentrace chlorofylu-a v čase.

Při experimentech se porovnávala hodnota koncentrace chlorofylu-a v $t = 0$ min a v čase $t = 24$ hod. Počáteční koncentrace chlorofylu-a byla stanovena v rozmezí 153,020 – 155,98 mg/l.



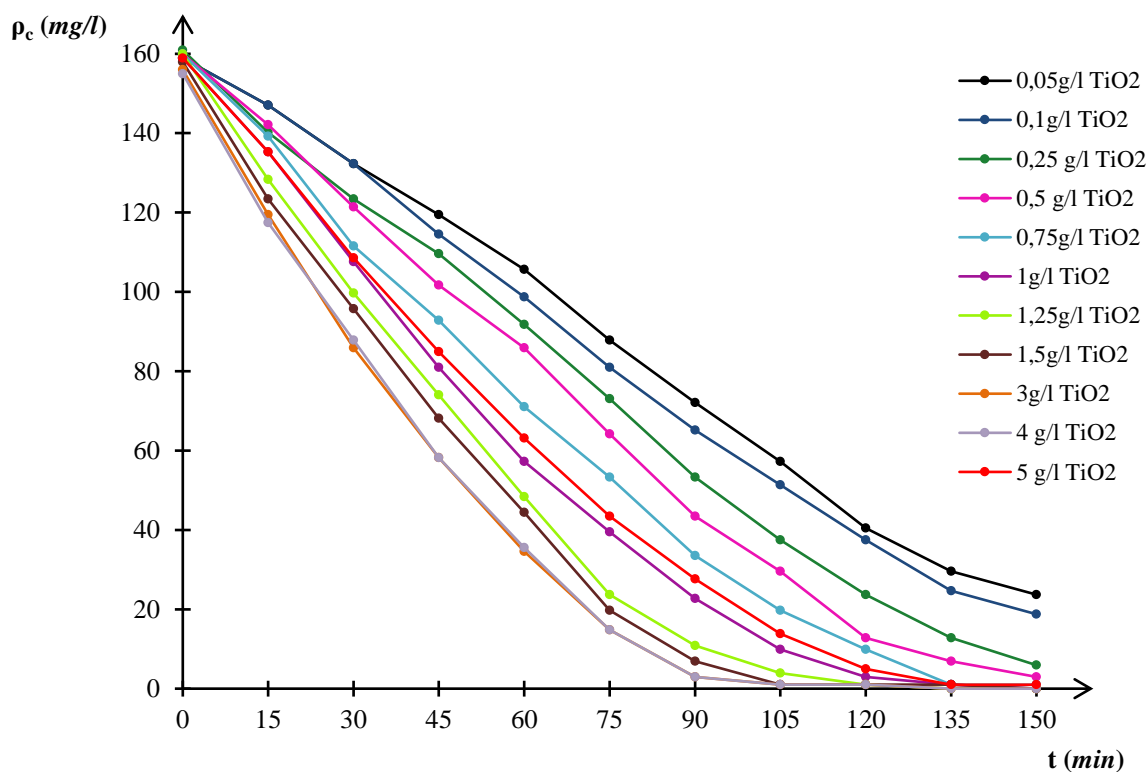
Graf 1 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase – fotolýza

Z výsledků experimentu (graf 1) je patrné, že koncentrace chlorofylu-a po 24 hodinách vzrostla. Koncentrace se zvýšila o přibližně 37,5 %. Lze tedy konstatovat, že řasy patří mezi relativně rychle rostoucí organismy při dodržení optimálních podmínek (světlo, teplo) pro jejich růst. Vzhledem k použité vlnové délce záření (365 nm) odpovídá tento výsledek očekávání.

7.3 Odstraňování řas pomocí fotokatalýzy

Při fotokatalytickém odstraňování vzorku řas byla sledována závislost poklesu koncentrace chlorofylu-a v čase.

Při experimentech se porovnávaly různé koncentrace katalyzátoru na bázi TiO_2 . Experimenty byly prováděny s koncentrací katalyzátoru 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,25 g/l, 0,5g/l, 0,75 g/l, 1 g/l, 1,25 g/l, 1,5 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l a s počáteční koncentrací vzorku řas o přibližné koncentraci 160 mg/l.



Graf 2 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při různé koncentraci katalyzátoru

Z uvedených výsledků (graf 2) plyne, že při koncentraci katalyzátoru 1,5 g/l, 3 g/l, 4 g/l již po 105 min je koncentrace chlorofylu-a 0 mg/l, se zvyšující se koncentrací katalyzátoru je průběh reakce strmější. Při koncentraci TiO_2 1,25 g/l je koncentrace chlorofylu-a 0 mg/l po 120 min, pro koncentraci katalyzátoru 0,75 g/l bylo pro dosažení 0 mg/l chlorofylu-a potřeba času 135 min. Dále z výsledků vyplývá, že použitím koncentrací katalyzátoru TiO_2 0,05 g/l – 0,5 g/l se nedosáhne koncentrace chlorofylu-a 0 mg/l. Výsledky také prokázaly, že navyšování koncentrace katalyzátoru nad 4 g/l již nepovede k zvyšování účinnosti a rychlosti odstraňování chlorofylu-a, toto konstatování potvrzuje fakt, že při koncentraci katalyzátoru 5 g/l, již došlo ke snížení odstraňování chlorofylu-a jako při použití koncentrace katalyzátoru 1 g/l. Důvodem je, že již při takové koncentraci katalyzátoru dochází k tomu, že se vytvoří větší shluky titanové běloby, čímž se zmenší její povrch, a tak dochází ke snížené tvorbě hydroxylových radikálů, které by degradovaly chlorofyl-a. Optimální hodnota katalyzátoru z hlediska rychlosti a účinnosti odstraňování chlorofylu-a je tedy 3 g/l (průběh je totožný s koncentrací TiO_2 4 g/l), vezmeme-li v potaz i ekonomické hledisko, pak jako optimální koncentraci lze doporučit 1,5 g/l TiO_2 .

7.4 Odstraňování řas pomocí H₂O₂

Při odstraňování vzorku řas pomocí H₂O₂ byla sledována závislost poklesu koncentrace chlorofylu-a v čase.

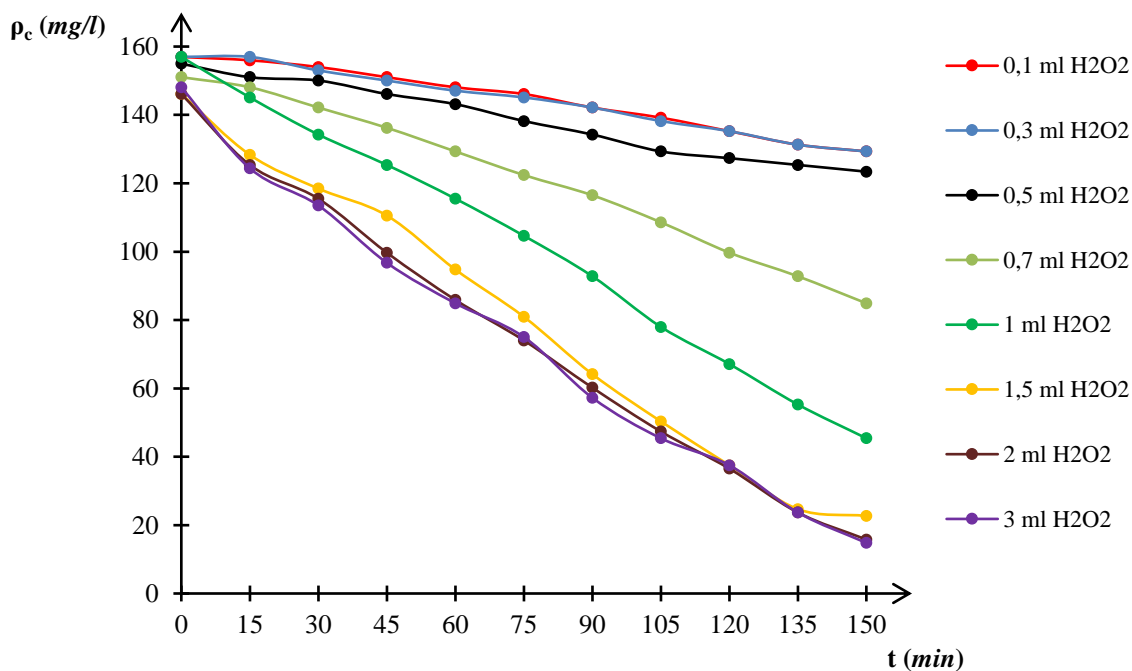
Byly provedeny dvě série experimentů. V první se sledoval pouze vliv přídavku samotného H₂O₂, ve druhé pak kombinovaný vliv přídavku H₂O₂ a UV-LED lampy.

Experimenty s přídavkem H₂O₂

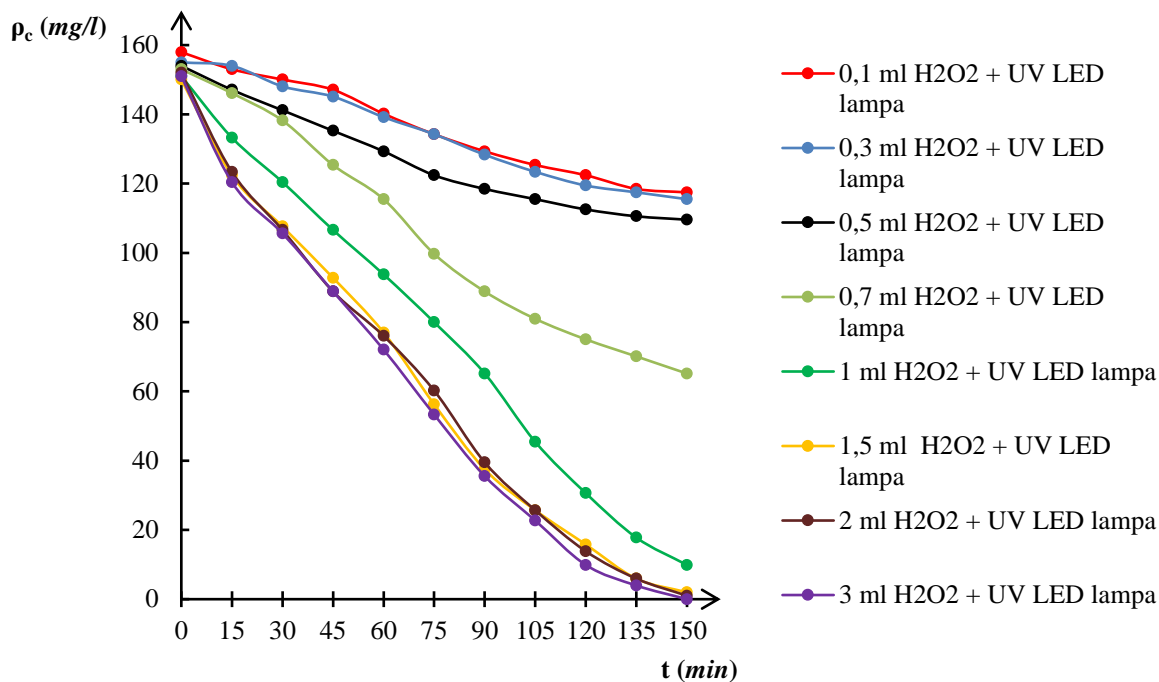
Experimenty byly prováděny s přídavky H₂O₂ (0,1 ml, 0,3 ml, 0,5 ml, 0,7 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml a 3ml) a s počáteční koncentrací chlorofylu-a ve vzorku řas o přibližné koncentraci 160 mg/l. Výsledky jsou v grafické podobě v grafu 3 a znázorňují, že v použitém koncentračním rozsahu nebylo dosaženo 100% úbytku chlorofylu-a.

Experimenty s přídavkem H₂O₂ a pomocí UV-LED lampy

Byly provedeny experimenty se stejnými přídavky H₂O₂ jako v předešlém případě, ale s tím rozdílem, že vzorky byly dále během experimentu ozařovány za použití UV-LED lampy. Výsledky jsou znázorněny v grafu 4. Je patrný pozitivní vliv přidaného UV záření, neboť došlo k zvýšení účinnosti odstraňování chlorofylu-a. Od přídavku 0,7 ml H₂O₂ je průběh daleko strmější. Od přídavku 1,5 ml H₂O₂ již bylo po 150 minutách dosaženo koncentrace chlorofylu-a 0 mg/l.



Graf 3 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, s různými přídavky H₂O₂



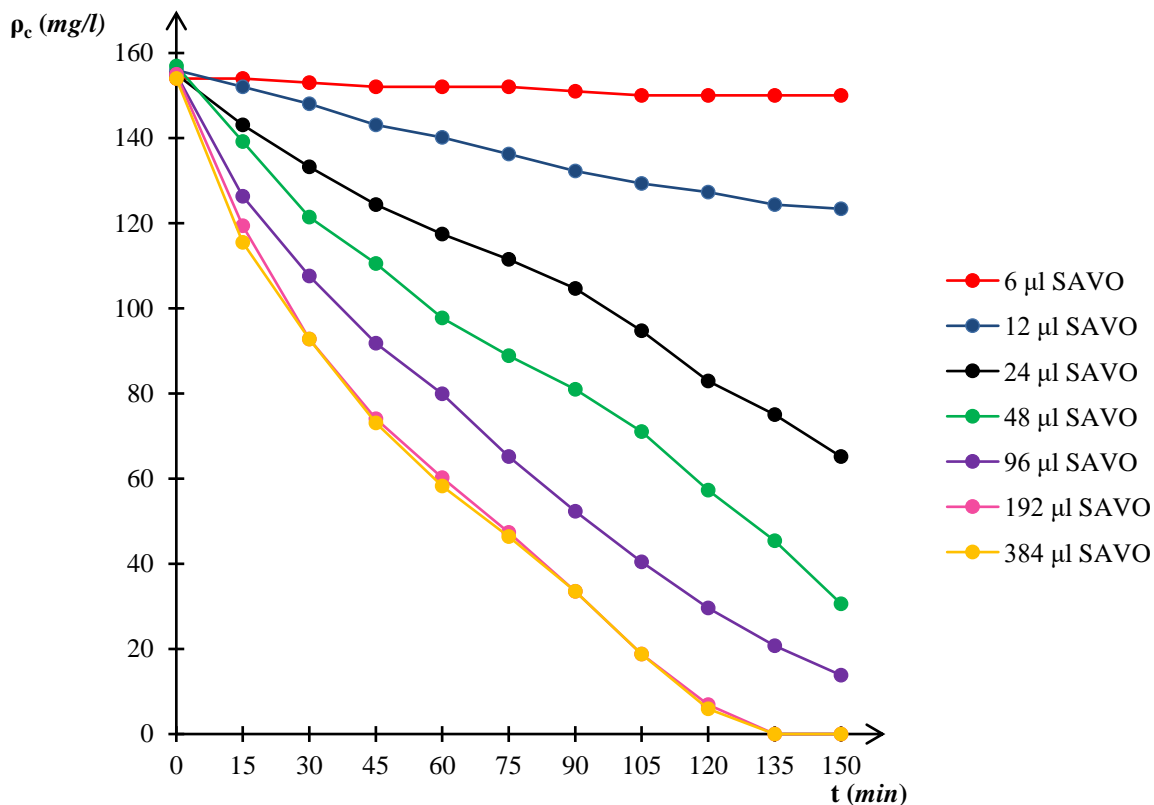
Graf 4 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, s různými přídávky H₂O₂ s použitím UV-LED lampy

Z výsledků experimentů (graf 3, 4) je patrné, že použitím UV-LED lampy jsou reakce účinnější. V obou experimentech při přídávku H₂O₂ (1,5 ml, 2 ml, 3 ml) je koncentrace chlorofylu-a po 150 minutách 0 mg/l, avšak s použitím UV-LED lampy má závislost strmější průběh. Při použití vhodného přídávku H₂O₂ je účinnost této metody 100%.

7.5 Odstraňování řas pomocí SAVO original

Při odstraňování řas byla sledována závislost poklesu koncentrace chlorofylu-a v čase.

Při experimentech se porovnávaly různé přídávky SAVO original. Experimenty byly prováděny s přídávky SAVO original 6 μl, 12 μl, 24 μl, 48 μl, 96 μl, 192 μl a 384 μl.



Graf 5 – Závislost koncentrace chlorofylu-a a na čase po různém přidavku SAVO original

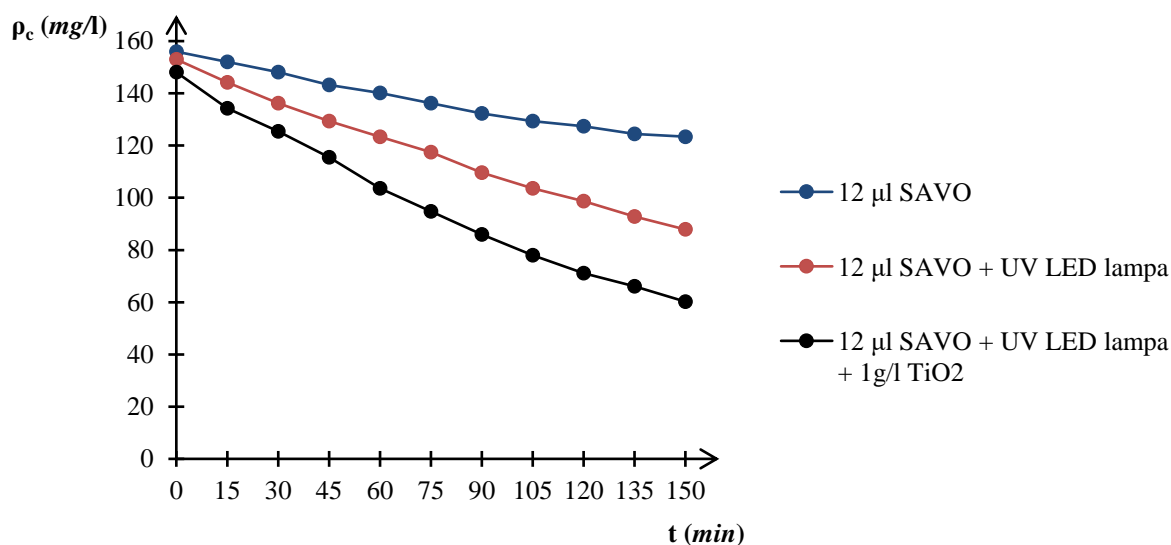
Z uvedených výsledků (graf 5) vyplývá, že po přidavku 6 μl SAVO original byly po 150 minutách odstraněny pouze 2,56 % chlorofylu-a. Po přidavku 12 μl SAVO original klesla koncentrace chlorofylu-a po 150 minutách z 155,98 mg/l na 123,40 mg/l, odstranilo se tedy 20,89 % chlorofylu-a. Po přidavku 24 μl SAVO original klesla koncentrace chlorofylu-a po 150 minutách z 154,99 mg/l na 65,16 mg/l, odstranilo se 57,96 % chlorofylu-a. Přídavkem 48 μl bylo po 150 minutách odstraněno 80,50 % chlorofylu-a. Po přidavku 96 μl SAVO original bylo po 150 minutách odstraněno 91,08 % chlorofylu-a. Přídavkem 192 μl a 384 μl SAVO original klesla koncentrace chlorofylu-a na 0 mg/l již po 135 minutách. Z experimentů vyplývá, že přidavkem dvojnásobku SAVO original klesá dvojnásobně koncentrace chlorofylu-a.

Výrobce uvádí, že šoková dávka při výskytu řas je 240 ml SAVO original na 3 m³ vody, což tedy odpovídá 24 μl SAVO original na 300 ml vody. Z našich výsledků je však zřejmé, že touto dávkou se odstranilo pouze 57,96 %. Pro 100% odstranění množství řas (odpovídajícímu 160 mg/l chlorofylu-a) by bylo potřeba dávkovat 8-mi násobek doporučeného množství SAVO original.

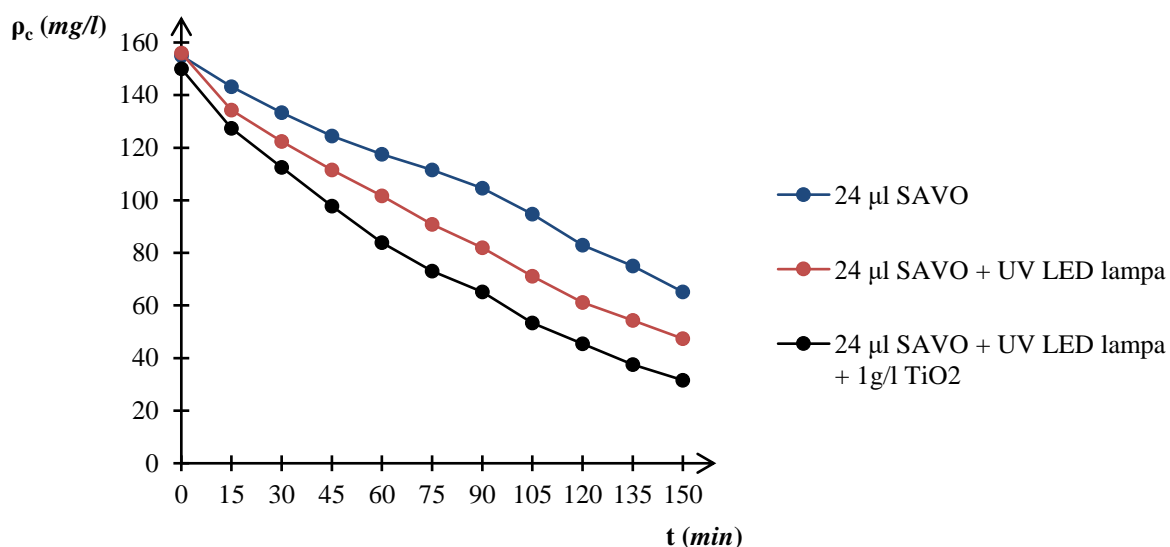
Odstraňování řas pomocí fotokatalýzy s přídavkem SAVO original

Při odstraňování řas byla sledována závislost poklesu koncentrace chlorofylu-a v čase.

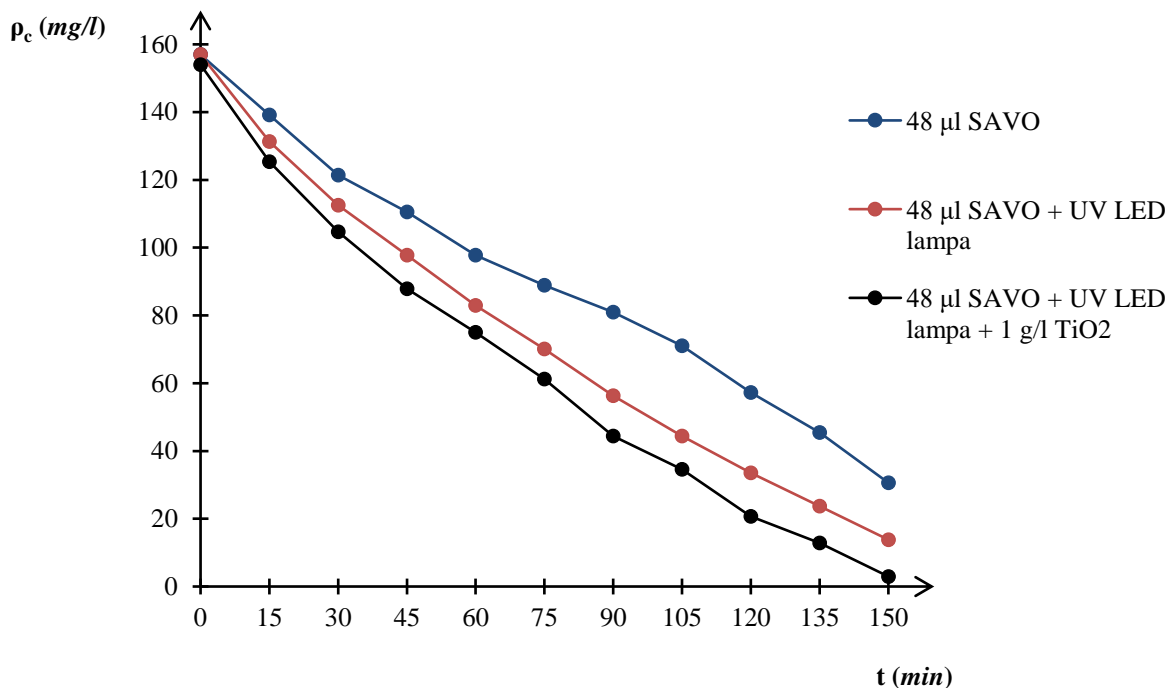
Při těchto experimentech se porovnávaly účinky přídavků (12 μl , 24 μl , 48 μl) SAVO original, přídavků stejných přídavků SAVO original s použitím UV-LED lampy a stejných přídavků SAVO original s přídavkem katalyzátoru (1 g/l) s použitím UV-LED lampy.



Graf 6 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přídavku 12 μl SAVO original



Graf 7 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přídavku 24 μl SAVO original



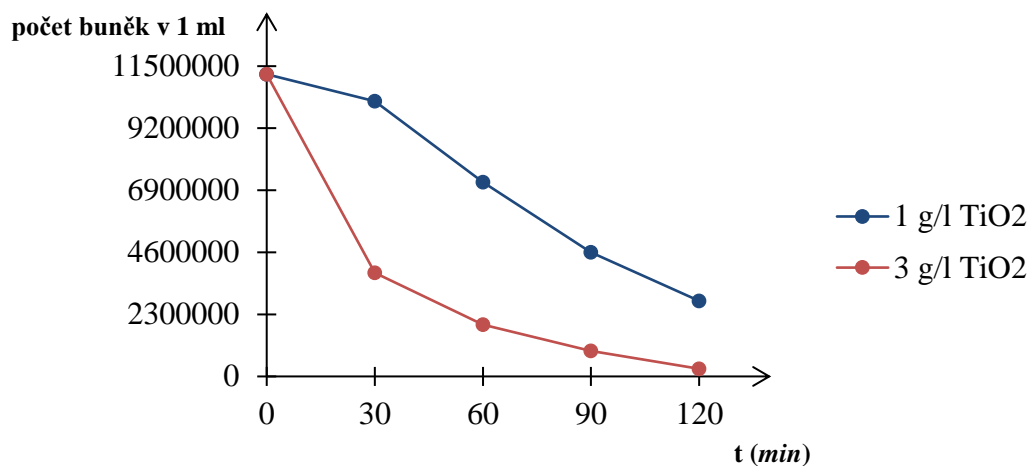
Graf 8 – Závislost koncentrace chlorofylu-a na čase, při přidavku 48 μl SAVO original

Z výsledků (graf 6, 7, 8) vyplývá, že v porovnání mezi přidavky 12 μl, 24 μl a 48 μl je neúčinnější přidavek 48 μl SAVO original. Při porovnání metod mezi přidavkem SAVO original, přidavkem SAVO original s použitím UV-LED lampy a přidavkem SAVO original s použitím katalyzátoru (1 g/l) a s použitím UV-LED lampy, je neúčinnější metodou přidavek katalyzátoru s použitím UV-LED lampy. Při použití 48 μl SAVO original, 1 g/l katalyzátoru a UV-LED lampy se odstranilo 98,08 % chlorofylu-a.

7.6 Odstraňování kvasinek pomocí fotokatalýzy

Při fotokatalytickém odstraňování vzorku kvasinek byla sledována závislost poklesu počtu buněk v čase. Pro měření byla použita metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou.

Při experimentech se porovnávaly různé koncentrace katalyzátoru na bázi TiO₂. Experimenty byly prováděny s koncentrací katalyzátoru 1 g/l, 3 g/l. Počáteční zákal $4 \pm 0,1$ McFarland.



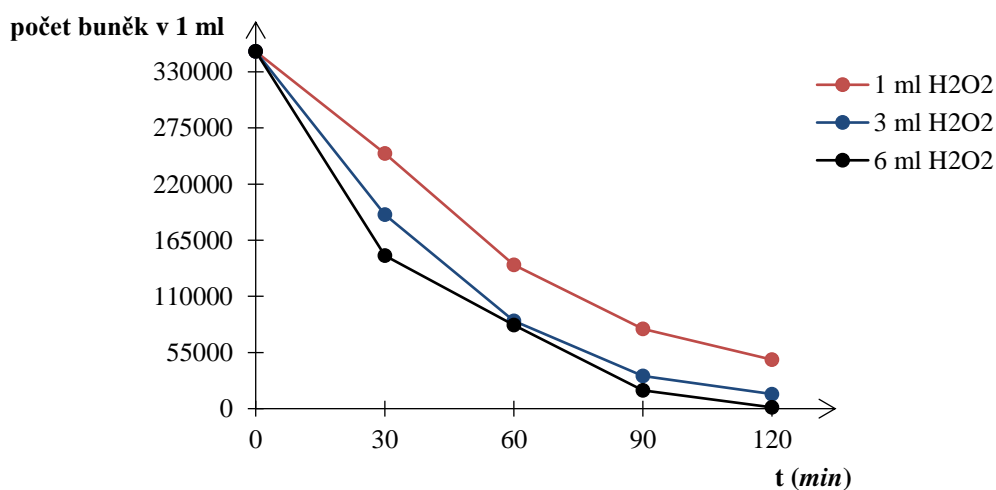
Graf 9 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přidavek katalyzátoru TiO₂

Ze závislosti (graf 9) vyplývá, že při zákalu $4 \pm 0,1$ McFarland je na počátku $1,12 \cdot 10^7$ kvasinek. Při přidavku 1 g/l TiO₂ je po 120 min odstraněno 75 % kvasinek. Při přidavku 3 g/l TiO₂ je po 120 min odstraněno 97,5 % kvasinek.

7.7 Odstraňování kvasinek pomocí H₂O₂

Při odstraňování kvasinek použitím peroxidu vodíku byla sledována závislost počtu buněk v čase. Byla použita metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou.

Při těchto experimentech se porovnávaly účinky přidavků (1 ml, 3 ml, 6 ml) peroxidu vodíku. Počáteční zákal byl $4 \pm 0,1$ McFarland.



Graf 10 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přidavek H₂O₂

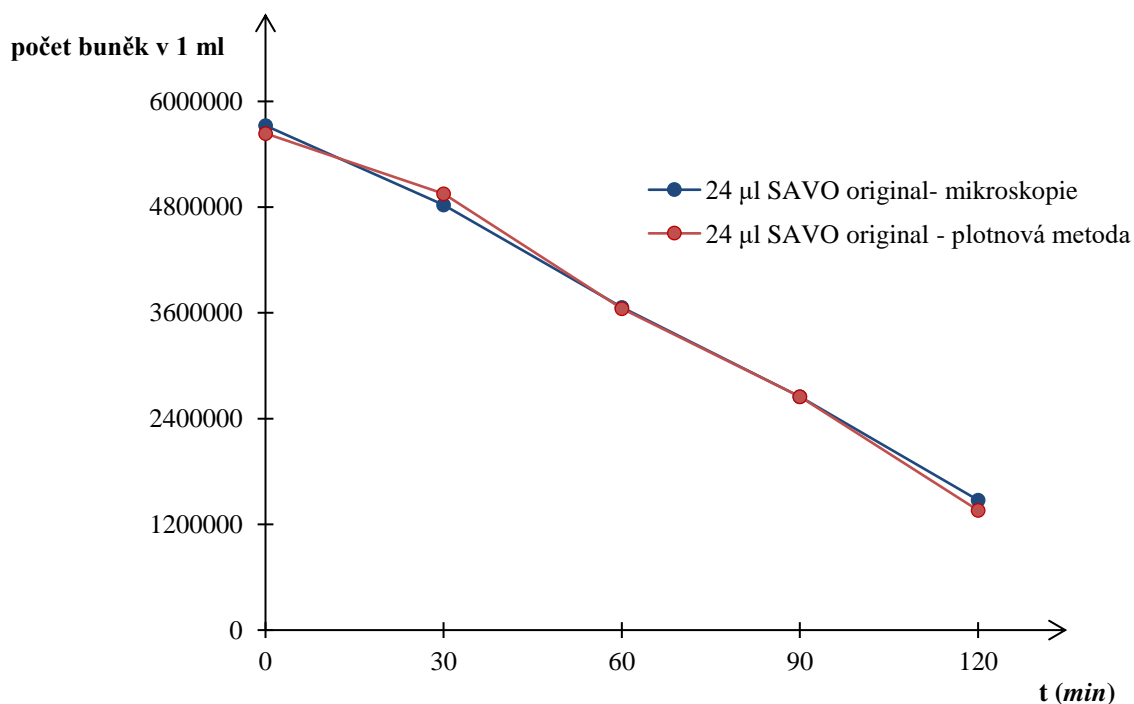
Z grafu 10 je patrné, že na počátku bylo $3,3 \cdot 10^5$ kvasinek. Oproti předchozímu experimentu je počet buněk výrazně nižší.

Z grafu dále vyplývá, že přidavek 3 ml a 6 ml H_2O_2 odstraňuje kvasinky podobnou rychlostí. Avšak při přidavku 6 ml H_2O_2 je odstraněno po 120 minutách 99,64 % kvasinek a u přidavku 3 ml H_2O_2 je odstraněno 95,9 % kvasinek. Při použití 1 ml H_2O_2 je odstraněno 86,3 % kvasinek. Byly zkoumány i menší přídávky H_2O_2 , avšak u těchto nebyly prokazatelné žádné výsledky, proto nejsou v grafu uvedeny.

7.8 Odstraňování kvasinek pomocí SAVO original

Při tomto stanovení u přidavku 24 μ l SAVO original byly využity obě dvě metody: metoda přímého počítání buněk v Bürkerově komůrce s použitím světelného mikroskopu a metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou. Tyto dvě metody se mezi sebou porovnávaly.

Při dalším experimentu se sledovala závislost úbytku počtu buněk v 1 ml na čase. Porovnávaly se 3 přídávky SAVO original – 12 μ l, 24 μ l a 48 μ l. Při tomto experimentu byla použita metoda přímého stanovení počtu buněk. Počáteční zákal byl $4 \pm 0,1$ McFarland.

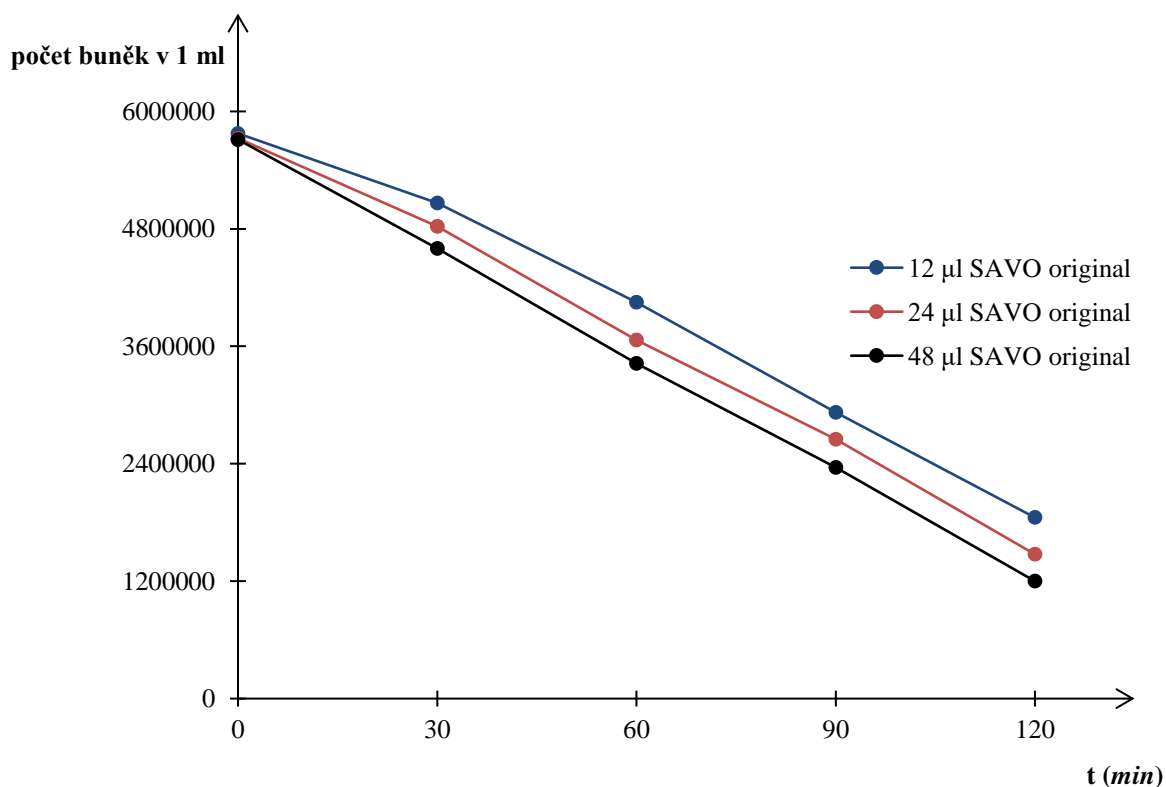


Graf 11 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – přidavek 24 μ l SAVO original

Ze závislosti (graf 11) vyplývá, že počáteční počet buněk byl $6,0 \cdot 10^6$ kvasinek. V tomto případě, se počet buněk také liší, rozdíl může mít stejnou příčinu jako v předcházejícím experimentu.

Z grafu je patrné, že počet buněk lineárně klesá, avšak ani těmito přídávky nedojde po 120 min k úplnému odstranění kvasinek. Z výsledků je patrné, že po přidavku dvojnásobné dávky, než je dávka doporučená výrobcem (6 μ l SAVO original na 300 ml), se po 120 min odstranilo 75 % kvasinek. Po 30 min se odstranilo pouze 12 % kvasinek.

Dále je ze závislosti zřejmé, že metoda přímého stanovení počtu buněk a metoda nepřímého stanovení počtu plotnovou metodou vykazují prakticky shodné výsledky.



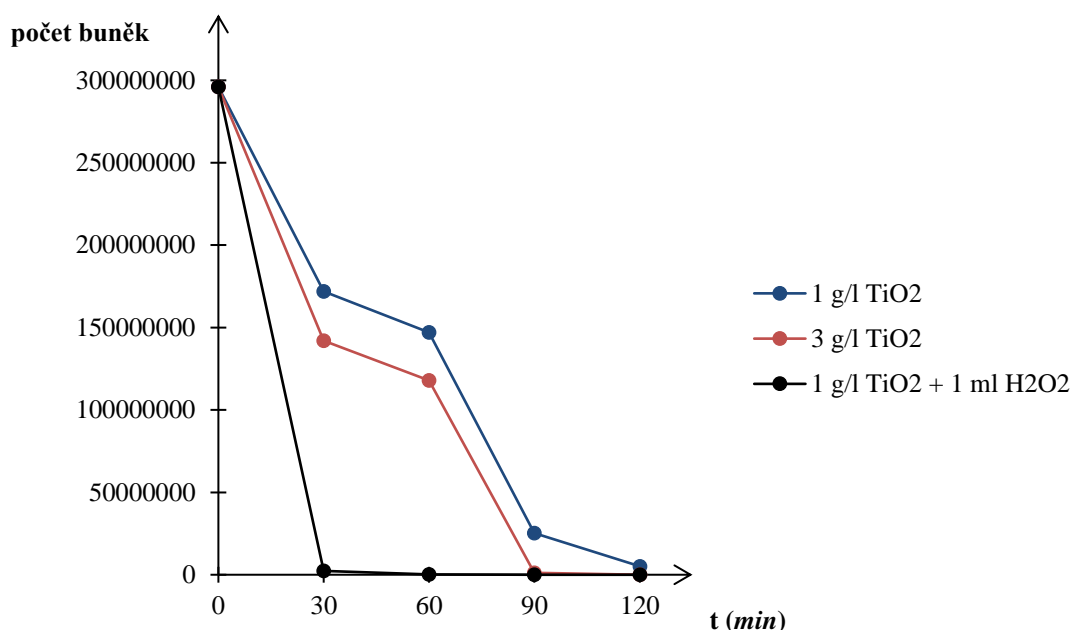
Graf 12 – Závislost počtu kvasinek v 1 ml na čase – metoda přímého stanovení s přídávkem SAVO original

Z výsledků (graf 12), kde byly použity 3 přídávky SAVO original – 12 μ l, 24 μ l a 48 μ l, je patrné, že rozdíl v odstranění není nijak razantní. Při nejnižším přídávku se po 120 min odstranilo 68 % kvasinek, při přídávku 24 μ l se odstranilo 75 % kvasinek a při nejvyšším přídávku SAVO original se odstranilo 79 % kvasinek. Při tomto experimentu se prováděla pouze metoda přímého stanovení počtu buněk, protože v předcházejícím experimentu (graf 11) bylo ověřeno, že obě dvě metody jsou stejně spolehlivé.

7.9 Odstraňování *E. coli* pomocí fotokatalýzy

Při fotokatalytickém odstraňování *E. coli* byla sledována závislost poklesu počtu buněk v čase. Pro stanovení počtu byla použita metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou.

Při experimentech se porovnávaly různé koncentrace katalyzátoru na bázi TiO_2 . Experimenty byly prováděny s koncentrací katalyzátoru 1 g/l, 3 g/l a s počátečním zákalem 0,5 McFarland. Dále byl proveden experiment, kdy byl ke vzorku bakterií byl přidán 1 g/l katalyzátoru na bázi TiO_2 a 1 ml H_2O_2 .



Graf 13 – Závislost počtu *E. coli* v 1 ml na čase – přidavek katalyzátoru TiO_2 (popř. H_2O_2)

Na grafu 13 je znázorněno počáteční množství buněk, odpovídající zákalu 0,5 McFarland, které je $3,0 \cdot 10^8$. Dále je patrné, že při přidavku 1 g/l TiO_2 se odstranilo po 120 minutách 98,3 % bakterií a při přidavku 3 g/l TiO_2 se po 90 minutách odstranilo 90 % a po 120 minutách se odstranilo již 100 % bakterií *E. coli*. Je patrné, že rozdíl v rychlosti odstraňování mezi jednotlivými přidavky není nijak velký.

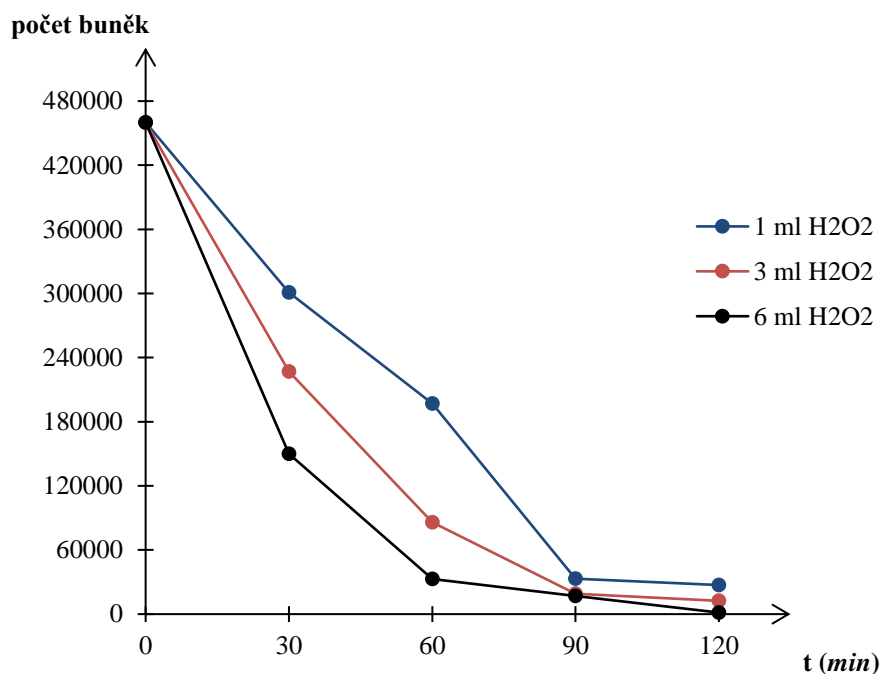
Dále je z grafu zřejmé, že při přidavku 1 g/l TiO_2 a 1 ml H_2O_2 se po 120 minutách odstranilo téměř 100 % (zůstalo $3,9 \cdot 10^3$ buněk), avšak průběh reakce je výrazně rychlejší oproti samotnému přidavku TiO_2 , protože po 30 minutách je úbytek bakterií 99%. Podle

mikrobiologických ukazatelů a limitů je však nejvyšší přípustnou hodnotou pro pitnou vodu přítomnost *E. coli* odpovídající 0 CFU/100 ml.

7.10 Odstraňování *E. coli* pomocí H₂O₂

Při odstraňování *E. coli* pomocí přídatku H₂O₂ byla sledována závislost poklesu počtu buněk v čase. Pro stanovení počtu byla použita metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou.

Při experimentech se porovnávaly různé koncentrace přídatku H₂O₂ (1 ml, 3 ml, 6 ml) a s počátečním zákalem 0,3 McFarland.



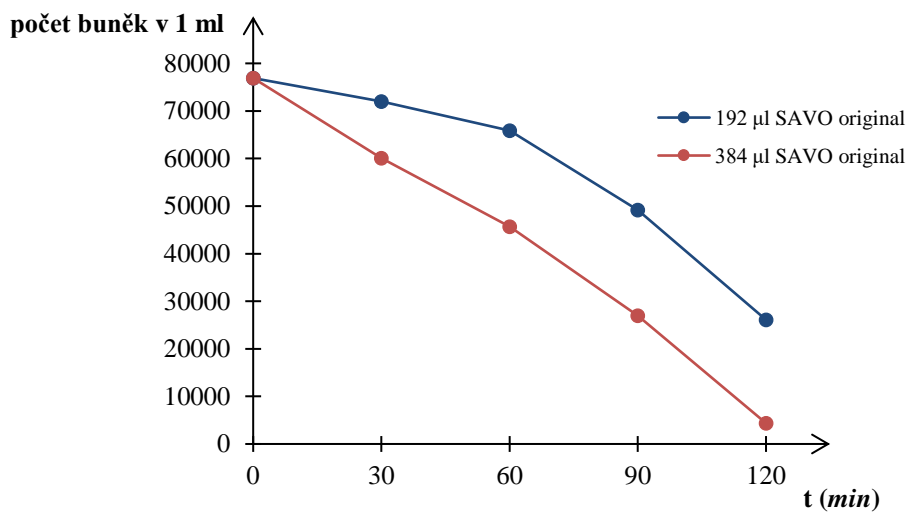
Graf 14 – Závislost počtu *E. coli* na čase – přídatvek H₂O₂

Ze závislosti (graf 14) vyplývá, že zákalu 0,3 McFarland odpovídá počáteční počet buněk *E. coli* $4,6 \cdot 10^5$. Je patrné, že při přídatku 1 ml H₂O₂ se po 120 minutách odstraní 94,1 % bakterií. Přídatkem 3 ml H₂O₂ se odstraní po 2 hodinách 97,3 % bakterií. Po přidání 6 ml H₂O₂ se odstranilo 99,7 % buněk *E. coli*, avšak počet buněk byl po 120 minutách $1,5 \cdot 10^3$, což je opět hodnota nevyhovující mikrobiologickým limitům.

7.11 Odstraňování *E. coli* pomocí SAVO original

Při odstraňování *E. coli* pomocí přídatku SAVO original byla sledována závislost poklesu počtu buněk v čase. Pro stanovení počtu byla použita metoda nepřímého stanovení počtu buněk plotnovou metodou.

Při experimentech se porovnávaly různé koncentrace přídatku SAVO original (192 μl a 384 μl) s počátečním zákalem 0,2 McFarland. Byly provedeny i pokusné experimenty s nižšími přídávky (12 μl , 24 μl , 48 μl), avšak při těchto experimentech nebyl patrný žádný pokles, proto data nejsou v grafu uvedena.



Graf 15 – Závislost počtu *E. coli* na čase – přídatku SAVO original

Z grafu 15 je zřejmé, že počáteční počet buněk *E. coli* v 1 ml je $7,7 \cdot 10^4$. Tato hodnota odpovídá zákalu 0,2 McFarland. V grafu je znázorněná závislost úbytku počtu buněk při přídatku 192 μl a 384 μl SAVO original. Tato hodnota odpovídá 8násobku/16násobku šokové dávky (240 ml SAVO original na 3 m^3 vody) uvedené na obalu od výrobce. U této metody byl stanoven nižší zákal, protože výrobce neuvádí, při jakém množství je SAVO original účinné, proto jsme volili nižší zákal, aby byly prokazatelné účinky.

Z grafu vyplývá, že tyto přídávky bakterie neodstranily. Po 120 minutách při přídatku 192 μl bylo odstraněno 66,1 % *E. coli*. Při přídatku 384 μl bylo po 2 hodinách odstraněno 94,3 % bakterií, ale konečný počet buněk je $4,4 \cdot 10^4$, což opět znamená, že to nevyhovuje mikrobiologickému limitu (0 CFU/1ml).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zpracovat literární rešerši zaměřenou na snižování biologické kontaminace ve vodách a experimentálně vyzkoušet vybrané metody, kterými by bylo možné tuto kontaminaci z vody odstranit.

Testovanými metodami byla fotolýza, fotokatalýza, použití peroxidu vodíku, chlornanu sodného (SAVO original) a jejich kombinace s fotolýzou a fotokatalýzou. Jako modelové příklady biologické kontaminace byla použita řasa *Parachlorella kessleri*, kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Escherichia coli*.

V případě odstraňování řas vyjádřené poklesem koncentrace chlorofylu-a bylo dosaženo těchto výsledků:

Při samotném použití peroxidu vodíku nebylo v čase 150 minut ani v případě přídavku 3 ml H₂O₂ dosaženo 100% odstranění chlorofylu-a. Účinnost se zvýšila použitím kombinace H₂O₂ s UV-LED lampou, kdy bylo již při přídavku 1,5 ml H₂O₂ dosaženo po 150 minutách hodnoty koncentrace chlorofylu-a 0 mg/l.

Experimenty za použití fotokatalýzy (fotokatalyzátor TiO₂) prokázaly výbornou účinnost pro snižování koncentrace chlorofylu-a. Z ekonomického pohledu a z hlediska účinnosti a rychlosti odstranění chlorofylu-a je optimální množství použitého katalyzátoru 1,5 g/l TiO₂.

Použitím přípravku SAVO original bylo dosaženo 100% účinku odstranění chlorofylu-a až při přídavku 192 µl. Doporučené dávkování dané výrobcem je 240 ml na 3 m³ vody, při tomto dávkování bylo dosaženo 58% úbytku chlorofylu-a.

V případě odstraňování kvasinek vyjádřené úbytkem počtu buněk v 1 ml bylo dosaženo těchto výsledků:

Při odstraňování pomocí H₂O₂ byly testovány 3 různé přídavky (1 ml, 3 ml, 6ml H₂O₂). Až za použití nejvyššího přídavku bylo po 120 min dosaženo 100% odstranění kvasinek.

Při fotokatalytickém odstranění byly použity dvě navážky katalyzátoru TiO₂ (1 g/l, 3 g/l). V případě použití vyšší navážky bylo v čase 120 min dosaženo účinnosti odstranění kvasinek 97,5 %.

Experimenty s přídavkem SAVO original probíhaly na třech úrovních (12 µl, 24 µl, 48 µl) ani v jednom případě nebylo po 120 min dosaženo 100% odstranění kvasinek. Nejlepší výsledek byl dosažen s přídavkem 48 µl, a to 79 %.

V případě odstraňování *E. coli* vyjádřené úbytkem počtu buněk v 1 ml bylo dosaženo těchto výsledků:

Při odstraňování pomocí H₂O₂ byly testovány 3 různé přídavky (1 ml, 3 ml, 6 ml H₂O₂). Za použití nejvyššího přídavku bylo po 120 min dosaženo 99,7% odstranění *E. coli*.

Při fotokatalytickém odstranění byly použity dvě navážky katalyzátoru TiO₂ (1 g/l, 3 g/l). V případě použití vyšší navážky bylo v čase 90 min dosaženo 100% účinnosti odstranění *E. coli*. V případě použití kombinace fotokatalýzy (1 g/l TiO₂) a přídavku H₂O₂ (1 ml) bylo dosaženo 100% účinnosti odstranění *E. coli* již po 30 min.

Experimenty s přídavkem SAVO original probíhaly na třech úrovních (192 μl, 384 μl) ani v jednom případě nebylo po 120 min dosaženo 100% odstranění *E. coli*.

Obecně lze říci, že existuje řada metod, kterými je možné různé organismy z vody ostraňovat. Kromě testovaných metod stojí za zmínku např. použití membránových procesů. Ty jsou však ekonomicky a provozně náročnější než mnou testovaná metoda fotokatalytická.

ZDROJE

ABULHAMD, A. T. Characterization of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Aquatic Environments Using Phenotypic and Genotyping Method. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2009, **5**(6), 923-931.

ALLEN, M. J., EDBERG, S. C. a REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **92**(3), 265-274.

ASHBOLT N. J., WOK, G., SNOZZI, M. *Indicators of microbial water quality*. In: Fewtrell L, Bartram J, editors. *Water quality: guidelines, standards and health. Risk assessment and risk management for water-related infectious disease*. London: IWA Publishing; 2001, 289–315.

ASHBOLT, N. J. Microbial contamination of drinking water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology*. 2004, **198**(1-3), 229-238.

BAKER, R. W. *Membrane technology and applications*. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 978-047-0020-395.

BANDO S. Y., VALLE DO G. R. F, MARTINEZ, M. B., TRABULSI, L. R., MOREIRA-FILHO, C. A. *Characterization of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella strains by RAPD analysis*, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brazilia, 1998.

BARTRAM, J., COTRUVO, J., EXNER, M., FRICKER, C., GLASMACHER, A. *Heterotrophic plate count and drinking-water safety: The significance of HPCs for water quality and the human health*. WHO, Geneva. 2003. ISBN 9241562269.

BARTRAM, J. *Legionella and the prevention of legionellosis*. Geneva: World Health Organization, 2007. ISBN 978-924-1562-973.

BAUMANN, B. Multiresistant pathogens – a self-inflicted threat?. *Healthcare industry BW* [online]. Stuttgart: BIOPRO Baden-Württemberg, 2014 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/en/article/dossier/multiresistant-pathogens-a-self-inflicted-threat/>

BAUDIŠOVÁ, D. *Současné metody mikrobiologického rozboru vody; Příručka pro hydroanalytické laboratoře*. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, v.v.i., 2007, Praha. 104 s.

BERGER, C. N., CREPIN, V. F., JEPSON, M. A., ARBELOA, A. a FRANKEL, G. The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics. *Cell Microbiol*. 2009a, **11**(2), 309-322.

- BERGER, C. N., SHAW, R. K., RUIZ-PEREZ, F., NATARO, J. P., HENDERSON, I. R., PALLEN, M. J. a FRANKEL, G.. Interaction of enteroaggregative *Escherichia coli* with salad leaves. *Environmental microbiology reports*. 2009b, **1**(4), 234–239.
- BETANCOURT, W. Q. a ROSE, J. B. Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology*. 2004, **126**(1-2), 219-234.
- BIOCOTE. Five facts about *Shigella*. *BioCote* [online]. United Kingdom: BioCote team, 2015 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.biocote.com/blog/5-facts-about-shigella/>
- BLANC, D. S., CARRARA, P., ZANETTI, G. a FRANCIOLI, P. Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control *Legionella*: seven years of experience in a university teaching hospital. *The Journal Hospital Infection*. 2005, **60**(1), 69-72.
- BRIKKÉ, F. a BREDERO, M. *Linking technology choice with operation and maintenance in the context of community water supply and sanitation: A REFERENCE DOCUMENT FOR PLANNERS AND PROJECT STAFF*. Geneva, Switzerland: World Health Organization and IRC Water and Sanitation Centre, 2003. ISBN 92 4 156215 3.
- BUŇKOVÁ, L. a DOLEŽALOVÁ, M.. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010. ISBN 978-80-7318-973-0.
- BUCHBINDER, S., TREBESIUS, K. a JÜRGEN HEESEMAN, A. J. Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002, **292**(3-4), 241-245.
- CABRAL, J. P. S. Water Microbiology: Bacterial Pathogens and Water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010, **7**(10), 3657-3703.
- CDC. Water Treatment. *CDC* [online]. USA: Centers for Disease Control and Prevention, 2015 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: https://www.cdc.gov/healthywater/drinking/public/water_treatment.html
- CENIA. Zpráva o životním prostředí České republiky. In: *Cenia* [online]. 2015 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: http://www1.cenia.cz/www/sites/default/files/ZPRAVA_ZPCR_2014.pdf
- CLEVER, M., JORDT, F., KNAUF, R., RÄBINGER, N., RÜDEBUSCH, M. a HILKER-SCHEIBEL, R. Process water production from river water by ultrafiltration and reverse osmosis. *Desalination*. 2000, **131**(1-3), 325-336.
- CLOETE, E., ROSE, J., NEL, L. H. a FORD, T. *Microbial Waterborne Pathogens*. London: Iwa Pub, 2004. ISBN 978-1843390558.

- COLLIN, J. F., ZMIROU, D., FERLEY, J. P. a CHARREL, M. Comparison of Bacterial Indicators and Sampling Programs for Drinking Water Systems. *Applied and environmental microbiology*. 1988, **54**(8), 2073-2077.
- CORDEVANT, CH., TANG, J. S., CLELAND, D. a LANGE, M.. Characterization of Members of the Legionellaceae Family by Automated Ribotyping. *Journal of clinical microbiology*. 2003, **41**(1), 34-43.
- CORRY, J. E. L., CURTIS, C. D. W. a BAIRD, R. M. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology*. 1. Bristol: Elsevier, 2003. ISBN 0-444-51084-2.
- COTRUVO, J. A., DUFOUR, A., REES, G., BARTRAM, J. a CARR R.. *Waterborne Zoonoses: Identification, Causes, and Control*. London: IWA Publishing, 2004. ISBN 9241562730.
- COX, C. R., GILMORE, M. S. a COBURN, P. S. Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Curr Protein Pept Sci*. 2005, **6**(1), 77-84.
- CRITTENDEN, J. C., TRUSSELL, R. R., HAND, D. W., HOWE, K. J. a TCHOBANOGLOUS, G. Coagulation and Flocculation. In *Principles of Water Treatment*. Third edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2012a.
- CRITTENDEN, J. C., TRUSSELL, R. R., HAND, D. W., HOWE, K. J. a TCHOBANOGLOUS, G. Rapid Granular Filtration. In *Principles of Water Treatment*. Third edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2012b.
- CRITTENDEN, J. C., TRUSSELL, R. R., HAND, D. W., HOWE, K. J. a TCHOBANOGLOUS, G. Advanced Oxidation. In *Principles of Water Treatment*. Third edition. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2012d.
- CRUMP, J. A., KRETSINGER, K., GAY, K., *et al.* Clinical Response and Outcome of Infection with *Salmonella enterica* Serotype Typhi with Decreased Susceptibility to Fluoroquinolones: a United States FoodNet Multicenter Retrospective Cohort Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008, **52**(4), 1278-1284.
- ČSN EN ISO 5667: *Jakost vod – Odběr vzorků*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2008. 20 s. Třídící znak 75 7051
- ČSN EN ISO 8199: *Jakost vod – Obecný návod pro stanovení mikroorganismů kultivačními metodami*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2008. 20 s. Třídící znak 75 7810
- ČSN EN ISO 10260: *Jakost vod – Měření biochemických ukazatelů. Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu -a*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2008. 20 s. Třídící znak 75 7575

ČSN EN ISO 75 7221: *Kvalita vod – Klasifikace kvality povrchových vod*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2017. 20 s. Třídící znak 75 7221

ČSN EN ISO 75 7841: *Jakost vod - Stanovení mezofilních bakterií*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1999. 12 s. Třídící znak 75 7841

ČSN EN ISO 75 7842: *Jakost vod - Stanovení psychrofilních bakterií*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1999. 12 s. Třídící znak 75 7842

ČSN EN ISO 83 0521: *Mikrobiologický rozbor pitné vody. Odběr a příprava vzorků. 2. vyd.* Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 1978. 2 s. Třídící znak 83 0521

D'AOUST, J. a MAURER, J.. Salmonella Species. DOYLE, M. P. a BEUCHAT, L. R. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd ed. Washington: ASM Press, 2007, s. 187-236. ISBN 9781555814076.

DA SILVA, W. L., LANSARIN, M. A., LIVOTTO, P. R. a DOS SANTOS, J. H. Z. Photocatalytic degradation of drugs by supported titania-based catalysts produced from petrochemical plant residue. *Powder Technology*. 2015, **279**(1), 166-172.

DE LASA, H., SERRANO, B. a SALAICES, M. *Photocatalytic Reaction Engineering*. 1. Mexico: Instituto de Investigaciones Eléctricas, 2015. ISBN 9780387275918.

DEVINNEY, R., GAUTHIER, A., ABE, A. a FINLAY, B. B. Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cell Mol Life Sci*. 1999, **55**(6-7), 961-976.

DRISCOLL, J. A., BRODY, S. L., KOLLEF, M. H. The Epidemiology, Pathogenesis and Treatment of Pseudomonas aeruginosa Infections. *Drugs*. 2007, **67**, 351–368.

FARMER, J. J., JANDA, J. M., BRENNER, F. W., CAMERON, D. N., BIRKHEAD, K. M. *Genus Vibrio*. In Bergey's manual of systematic bacteriology, 2. vydání; Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2005, roč. 2, část B, 494 – 546.

FIELDS, B. S., BENSON, R. F. a BESSER, R. E.. Legionella and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. *Clin Microbiol Rev*. 2002, **15**(3), 506–526.

FRAHM, E. a OBST, U. Application of the fluorogenic probe technique (TaqMan PCR) to the detection of Enterococcus spp. and Escherichia coli in water samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2003, **52**(1), 123-131.

FRAIS, Z., DOBŠINSKÝ, O., ITZE, L., KURSA, J., PONÍŽILOVÁ, E. *Zoohygiena a prevence I.: Návod ke cvičení*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, 1983.

FREIMAN, A. Sports dermatology part 2: swimming and other aquatic sports. *CMAJ*. 2004, **171**(11), 1339–1341.

- FRESENIUS, W., QUENTIN, K. E. a SCHNEIDER, W. *Water Analysis a Practical Guide to Physico-Chemical, Chemical and Microbiological Water Examination and Quality Assurance*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1988. ISBN 9783642726101.
- GARRITY, G. M., SCHLEIFER, K. H., RAINEY, F. A., GOODFELLOW, M. a BRENNER, D. J. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd. edition – The Proteobacteria, Part A – Introductory Essays. New York: Springer US, 2005a. ISBN 9780387280226.
- GARRITY, G. M., SCHLEIFER, K. H., RAINEY, F. A., GOODFELLOW, M. a BRENNER, D. J. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2nd. edition – The Proteobacteria, Part B – The Gammaproteobacteria. New York: Springer US, 2005b. ISBN 9780387280226.
- GREENWOOD, D., PEUTHERER, J. a SLACK, R. *Lékařská mikrobiologie*. Praha: Grada, 1999. ISBN 8071693650.
- GREENWOOD, D. *et al. Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. 17th ed. Edinburgh: Elsevier, 2007. ISBN 978-0-443-10209-7.
- GOMBAC, V., DE ROGATIS, L., GASPAROTTO, A., *et al.* TiO₂ nanopowders doped with boron and nitrogen for photocatalytic applications. *Chemical Physics*. 2007, **339**(1-3), 111-123.
- HANOUSEK, M. *Voda pro chataře a zahrádkáře*. Praha: Grada, 2005. Profi & hobby. ISBN 80-247-0400-5.
- HARDIE, J. M. a WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. *Journal of Applied Microbiology*. 1997, **83**(S1), 1-11.
- HARTMAN, P., PŘIKRYL, I. a ŠTĚDRONSKÝ, E.. *Hydrobiologie*. 3., přeprac. vyd. Praha: Informatorium, 2005. ISBN 8073330466.
- HÄUSLER, J. *Mikrobiologické kultivační metody kontroly jakosti vod*. Díl 2, Mikrobiologický rozbor vod. Praha: Ministerstvo zemědělství ČR, 1994. ISBN 80-7084-107-9.
- HE, X., DE LA CRUZ, A.A., HISKIA, A., KALOUDIS, T., O'SHEA, K. a DIONYSIOU, D. D. Destruction of microcystins (cyanotoxins) by UV-254 nm-based direct photolysis and advanced oxidation processes (AOPs): Influence of variable amino acids on the degradation kinetics and reaction mechanisms. *Water Research*. 2015, **74**(1), 227-238.
- HONZAJKOVÁ Z., PODHOLOVÁ E., PATOČKA T., PODHOLA M.: *Využití nanofiltrace a ultrafiltrace k úpravě vody na vodu pitnou*. Sborník konference Pitná voda 2010, s. 107-112. W&ET Team, Č. Budějovice 2010. ISBN 978-80-254-6854-8.
- HRUDEY, S. E., PAYMENT, P., HUCK, P. M., GILLHAM, R. W. a HRUDEY, E. J. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Science and Technology*. 2003, **47**(3), 7-14.

HUYS, G. *The Family Aeromonadaceae*. The Prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, 2014, 27-57.

CHAIGNON, P., SADOVSKAYA, I., RAGUNAH, Ch., RAMASUBBU, N., KAPLAN, J. B. a JABBOURI, S. Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007, **75**(1), 125-132.

CHEASTY, T., SMITH, H. R. *Escherichia*. In: Borriello S. P., Murray P. R., Funke G. (eds), Topley and Wilson's microbiology and microbial infections, Bacteriology, Vol. 2, 10th edn. London: Hoder Arnold. 2005, 1360-1385.

CHEMLAL, K. a PORTAELS, F. Molecular diagnosis of nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Infect Dis*. 2003, **16**(2), 77-83.

CHOI, H., ZHANG, K., DIONYSIOU, D., OERTHER, D. a SORIAL, G. Effect of permeate flux and tangential flow on membrane fouling for wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*. 2005, **45**(1), 68-78.

CHONG, M. N., JIN, B., CHOW CH. W. K. a SAINT, CH. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*. 2010, **44**(10), 2997-3027

JANDA, J. M. a ABBOTT S. L. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin. Microbiol. Rev*. 2010, **23**(1), 35-73.

JAKRLOVÁ, J. a PELIKÁN J. *Ekologický slovník terminologický a výkladový*. Praha: Fortuna, 1999. ISBN 80-7168-644-1.

JELÍNEK, L. *et al. Desalinační a separační metody v úpravě vody*. 1. Vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-705-7.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M. a GILMORE, M. S.. Virulence of Enterococci. *Clinical microbiology reviews*. 1994, **7**(4), 462-478.

JO, W. K. a TAYADE, R. J. Facile photocatalytic reactor development using nano-TiO₂ immobilized mosquito net and energy efficient UVLED for industrial dyes effluent treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2016, **4**(1), 319-327.

JOHNSON, T. J. a NOLAN, L. K. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2009, **73**(4), 750-774.

JONÁŠ, F. *Pozemkové úpravy: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy zemědělské*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1990. 512s. ISBN 80-209-0106-x.

KAŠTOVSKÝ, J. Oddělení Cyanobacteria. *Www.sinicearasy.cz: Fykologická laboratoř na katedře botaniky Přírodovědecké fakulty JU v Českých Budějovicích* [online]. České Budějovice: Katedra botaniky PrF JU, 2018 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria>

- KATZIF, S., LEE, E. H., LAW, A. B. , TZENG, Y. L. a SHAFER W. M. CspA Regulates Pigment Production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-Dependent Mechanism. *J Bacteriol.* 2005, **187**(23), 8181-8184.
- KITANO, M., MATSUOKA M., UESHIMA M. a ANPO, M. Recent developments in titanium oxide-based photocatalysts. *Applied Catalysis A: General.* 2007, **325**(1), 1-14.
- KOLÍNSKÁ, R. Očekávané výsledky EHK-843 - bakteriologická diagnostika. *Státní zdravotní ústav* [online]. Praha: SZÚ, 2014 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ocekavane-vysledky-ehk-843-bakteriologicka-diagnostika>
- KOPECKÁ, J. a ROTKOVÁ G. Přímé stanovení počtu buněk v Bürkerově komůrce, vitální test, kvasinky. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií* [online]. Brno: Ústav experimentální biologie, oddělení mikrobiologie – Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, 2017 [cit. 2018-04-05]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/pocet_bunek_burkerova_komurka.html
- KUNC, F. a OTTOVÁ, V. *Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody*. Vyd. 3. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 8070802707.
- LeCRAW, R. A. The slow sand filtration alternative: Water treatment for small systems. In: *Environmental Science & Engineering Magazine* [online]. Canada: ESEMAG, 2000 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: <https://esemag.com/archive/0500/sand.html>
- LeCHEVALLIER, M., AU, K. K. *Water Treatment and Pathogen Control process efficiency in achieving safe drinking water*. Geneva: World Health Organization, 2004. ISBN 9241562552.
- LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001. ISBN 80-7305-415-9.
- MADAENI, S. S. The application of membrane technology for water disinfection. *Water Research.* 1999, **33**(2), 301-308.
- MAŘAR, R., PODSTATOVÁ, R. a ŘEHOŘOVÁ, J. *Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi*. Praha: Grada, 2006. ISBN 978-80-247-6277-7.
- MALÝ, J. a MALÁ, J. *Chemie a technologie vody. 2., dopl. vyd.* Brno: ARDEC, 2006. ISBN 80-86020-50-9.
- MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V. *Vodní květy sinic*. Ed.: MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P. Brno: Nadatio flos - aquae, 1996, 142.
- MATHEWSON, J. J., JOHNSON, P. C., DUPONT, H. L., MORGAN, D. R., THORNTON, S. A., WOOD, L. V. a ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of travelers' diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1985, **151**(3), 471-475.

MATILAINEN, A., IIVARI, P., SALLANKO, J., HEISKA, E. a TUHKANEN, T. The Role of Ozonation and Activated Carbon Filtration in the Natural Organic Matter Removal from Drinking Water. *Environmental Technology*. 2006, **27**(10), 1171-1180.

MELICHERČÍKOVÁ, V. *Sterilizace a dezinfekce*. 2. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-807-4921-391

MEREL, S., WALKER, D., CHICANA, R., SNYDER, S., BAURÈS, E. a THOMAS, O. State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment International*. 2013, **59**, 303-327.

MEREL, S., CLÉMENT, M. a THOMAS, O. State of the art on cyanotoxins in water and their behaviour towards chlorine. *Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology*. 2010, **55**(4), 677-691.

MICHEK, V. a DAŘÍČKOVÁ, A. *Upravujeme vodu doma a na chatě: [zdroj pitné vody, vyšetření kvality, úprava a dezinfekce]*. Praha: Grada, 2007. Profi & hobby. ISBN 978-80-247-1546-9.

MLEJNKOVÁ, H. a CHALOUPPEL, J. *Hygienické zabezpečení pitní a napájecí vody - návody k praktickým cvičením*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, fakulta veterinární hygieny a ekologie, ústav zootechniky a zoohygieny, 2014. ISBN 978-80-7305-755-8.

MOSSEL, D. A.A. a STRUIJK, C. B. Assessment of the microbial integrity, sensu G.S. Wilson, of piped and bottled drinking water in the condition as ingested. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, **92**(3), 375-390.

MUNI. *Kvantitativní hodnocení mikrobiálních kultur: Nepřímé stanovení počtu životaschopných buněk plotnovou metodou*. Brno, 2012. Studijní materiály. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.

NANNINI, E. C. a MURRAY, B. E. Enterococcus spp. GILLESPIE, S. a P. M. HAWKEY. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. 2nd ed. UK, 2006, s. 59-71. ISBN 978-0-470-84976-7.

NOBLE, R. T., MOORE, D. F., LEECASTER, M. K., MCGEE, C. D. a WEISBERG, S. B. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. *Water Research*. 2003, **37**(1), 1637-1643.

OLA, O. a MAROTO-VALER, M. M. Review of material design and reactor engineering on TiO₂ photocatalysis for CO₂ reduction. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2015, **24**(1), 16-42.

OLIVER, J. D. The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*. 2005, **43**, 93-100.

- OWEN, D. M., AMY, G. L., CHOWDHURY, Z. K., PAODE, R., MCCOY, G. A. VISCOSIL, K. NOM Characterization and Treatability. *Journal*. 1995, **87**(1), 46-63.
- PALLERONI N. J. Genus I. Pseudomonas, In: Garrity G., Boone D. R., Castenholz R. W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Verlag, New York. 2005a, 279-323
- PALLERONI N. J. Pseudomonas, In: Borriello, S.P., Murray, P.R., Funke, G. (eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Hodder Arnold, London. 2005b, 1591-1606
- PATON, J. C. a PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clin Microbiol Rev*. 1998, **11**(3), 450-479.
- PAULÍK, M. et al. *Vyšetřovací metody v imunologii*, Grada Publishing, 2005, 176 s., ISBN: 978-80-247-3533-7
- PELIKÁN, V. 1983. *Ochrana podzemních vod*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury.
- PELL, A. N. Manure and Microbes: Public and Animal Health Problem? *Journal of Dairy Science*. 1997, **80**(10), 2673-2681.
- PEPPER, I. L., GERBA, CH. P. a GENTRY, T. J. *Environmental microbiology*. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015. ISBN 978-0-12-394626-3.
- PITTER, P. *Hydrochemie*. 5. aktualizované a doplněné vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-928-0
- POULÍČKOVÁ, A., JURČÁK, J. *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. Olomouc: Univerzita Palackého, 2001. ISBN 80-244-0242-4.
- PRIMM, T. P., LUCERO, C. A. a FALKINHAM, J. O. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004, **17**(1), 98-106.
- PUI, C. F., WONG, W. C., CHAI, L. C. a TUNUNG, R. Salmonella: A foodborne pathogen. *International Food Research Journal*. 2011, **18**(2), 465-473.
- QADRI, F., SVENNERHOLM, A. M., FARUQUE, A. S. G. a SACK R. B. Enterotoxigenic Escherichia coli in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2005, **18**(3), 465-483.
- ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, J. *Koli-index, koli-titr*. *Encyklopedie hydrobiologie: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.html?p=K005
- SANSONETTI P. J. *Shigella*, MD Professeur à l'Institut Pasteur, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, John Wiley & Sons, New York, USA, 2010.

- SARTORY, D. P. *Aeromonas*. *WHO*. 2003, **2**(1), 1-17.
- SBÍRKA ZÁKONŮ. Zákon o vodách a o změně některých zákonů (vodní zákon). In: *Sbírka zákonů*. Praha, 2001, ročník 2001, 254/2001 Sb.
- SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007.
- SEIDEL, CH. J., MCGUIRE, M., SUMMERS, R. S. a VIA, S. Have Utilities Switched to Chloramines? *Journal - American Water Works Association*. 2005, **97**(10), 87-97.
- SIMON, C. a STILLE, W. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. Praha: Grada, 1998. ISBN 80-7169-268-9.
- SNYDER, K. Genomes of Two Popular Research Strains of *E. coli* Sequenced: Tracing the history, genetic makeup of workhorse laboratory bacteria. *Brookhaven: National laboratory* [online]. USA: Media & Communications Office, 2009 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <https://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=111019>
- STEINERT, M., HENTSCHEL, U. a HACKER, J. *Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray*. *FEMS microbiology reviews* . 2002, **26**(2), 149-162.
- STEVENS, M., ASHBOLT, N. a CUNLIFFE, D. *Recommendations to change the use of coliforms as microbial indicators of drinking water quality*. Australia: Biotext Pty, 2003. ISBN 1864961651.
- STRAŠKRABOVÁ, V. *Mikrobiální ekologie vody*. Praha: Ministerstvo životního prostředí České republiky, 1996. ISBN 80-85368-88-9.
- SUN, Q., LAN, R., WANG, Y., *et al.* Genesis of a novel *Shigella flexneri* serotype by sequential infection of serotype-converting bacteriophages SfX and SfI. *BMC Microbiol*. 2011, **11**(269), 1-6.
- ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-802-0017-031.
- ŠTEVKOVIČOVÁ, M. *et al.* *Dezinfekcia a sterilizácia: teória a prax II*. Žilina. 1. vyd.: Vrana, 2007. ISBN 8096824830
- ŠTĚPÁNEK, M. *et al.* 1979. *Hygienický význam životních dějů ve vodách*. Avicenum, Praha.
- ŠVEC, F. a PLESNÍK, V. *Hygiena a epidemiologie*. Praha: Avicenum, 1986.
- TLAPÁK, V., LEGÁT, V. a ŠÁLEK, J. *Voda v zemědělské krajině*. Praha: Brázda, 1992. ISBN 80-209-0232-5.
- TORTORELLO, M. L. Indicator Organisms for Safety and Quality—Uses and Methods for Detection: Minireview. *Journal of aoac international*. 2003, **86**(6), 1208-1217.

TU Delft. Granular filtration. *TU Delft OpenCourseWare* [online]. Delft: TU Delft, 2016 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: <https://ocw.tudelft.nl/wp-content/uploads/Granular-filtration-1.pdf>

VAN LEEUWEN, F. X. Safe drinking water: the toxicologist's approach. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2000, **38**(1), 51-58.

VAEREWIJCK, M. J.M., HUYS, G., PALOMINO, J. C., SWINGS, J. a PORTAELS, F. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, **29**(5), 911-934.

VIRCELL. Legionella pneumophila. *Vircell: microbiologists* [online]. Spain: vircell S.L., 2014 [cit. 2018-03-25]. Dostupné z: <http://en.vircell.com/diseases/20-legionella-pneumophila/%29/>

VIRTO, R., MANAS, P., ALVAREZ, I., CONDON, S. a RASO, J. Membrane Damage and Microbial Inactivation by Chlorine in the Absence and Presence of a Chlorine-Demanding Substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, **71**(9), 5022–5028.

VON GUNTEN, U. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*. 2003, **37**(7), 1469-1487.

VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1.vyd. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.

WANG, CH., ZHANG, X., WANG, J., LIU, S., CHEN, CH. a XIE, Y. Effects of organic fractions on the formation and control of N-nitrosamine precursors during conventional drinking water treatment processes. *Science of The Total Environment*. 2013, **449**(1), 295-301.

WARREN B. R., YUK, H. a SCHNEIDER, K. R. Detection of *Shigella sonnei* in selected foods by flow-through immunocapture followed by real-time polymerase chain reaction or isolation on macconkey agar, *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 2006, **14**, 309 – 324.

WESTRICK, J. A., SZLAG, D. C., SOUTHWELL, B. J. a SINCLAIR, J. A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010, **397**(5), 1705-1714.

WHO. Rapid Sand Filtration. *WHO* [online]. Geneva, Switzerland: WHO, 1996 [cit. 2017-10-22]. Dostupné z: http://www.who.int/water_sanitation_health/hygiene/emergencies/fs2_14.pdf

WHO. *Guidelines for drinking-water quality*. 3rd ed. Geneva: World Health Organization, 2004. ISBN 9241546387.

ZELINKA, Z. *Studny*. 2. dopl. vyd. Brno: ERA group, 2003. Stavíme. ISBN 80-865-1775-6.

ZHAO, C., PELAEZ, M., DIONYSIOU, D. D., PILLAI, S.C., BYRNE, J. A. a O'SHEA, K. E. UV and visible light activated TiO₂ photocatalysis of 6-hydroxymethyl uracil, a model compound for the potent cyanotoxin cylindrospermopsin. *Catalysis Today*. 2014, **224**(1), 70-76.

ZHOU, G., WEN, S., LIU, Y., LI, R., ZHONG, X., FENG, L., WANG, L. a CAO, B. Development of a DNA microarray for detection and identification of Legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, **145**(1), 293-300.